



Le dosage des cytochromes P450 (CYPs) humains par spectrométrie de masse : applications en toxicologie

Ahmad Al Ali

► To cite this version:

Ahmad Al Ali. Le dosage des cytochromes P450 (CYPs) humains par spectrométrie de masse : applications en toxicologie. Toxicologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P603 . tel-01124379

HAL Id: tel-01124379

<https://theses.hal.science/tel-01124379>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

École doctorale

Médicament, Toxicologie, Chimie et Imageries

INSERM UMRS 1147 'MEPPOT'

Le dosage des cytochromes P450 (CYPs) humains par Spectrométrie de Masse : applications en toxicologie

Par

Ahmad AL ALI

Thèse de doctorat de Toxicologie

Dirigée par Philippe BEAUNE

Présentée et soutenue publiquement le 10 juin 2014

Devant un jury composé de :

Emmanuelle LEIZE-WAGNER, DR

Rapporteur

André GUILLOUZO, Pr

Rapporteur

Olivier LAPRÉVOTE, Pr

Examineur

Alain BRUNELLE, DR

Examineur

David TOUBOUL, CR

Examineur

Philippe BEAUNE, Pr

Directeur de thèse

Résumé

Les cytochromes P450 (CYPs) jouent un rôle essentiel dans le métabolisme oxydatif de nombreux composés endogènes et exogènes. L'expression de CYPs est extrêmement variable en fonction de facteurs physiopathologiques, génétiques et environnementaux. Le métabolisme des xénobiotiques par les CYPs dépend en partie de la nature, de la quantité et de l'activité d'isoformes des CYPs impliqués.

L'analyse quantitative de l'expression de CYP dans les organes du métabolisme, tels que le foie, sont d'une importance particulière étant donné que la biotransformation réalisée par les CYPs est souvent un facteur critique qui affecte l'efficacité, la disponibilité et la toxicité des médicaments chez l'homme.

La technique actuelle de dosage la plus courante est l'immunoquantification par Western Blot. Cette technique est limitée par la disponibilité et la spécificité de l'anticorps. Les techniques de protéomique par spectrométrie de masse, permettant d'analyser de très faibles quantités de protéines en mélange, sont les méthodes de choix pour l'identification et la quantification des CYPs dans différents organes.

Nous avons développé et validé une méthode pour doser 6 CYPs (1A2, 2C9, 2D6, 2J2, 3A4 et 3A5) par spectrométrie de masse en couplage chromatographique.

Cette méthode, simple, rapide de sensibilité satisfaisante et peu coûteuse, a été validée dans différents types de matrices biologiques (lignées cellulaires hépatiques et neuronales, baculosomes). Ensuite, elle a été appliquée à grande échelle pour l'analyse de 50 foies humains (microsomes et mitochondries) afin d'étudier la relation phénotype/génotype pour les CYPs.

Cette méthode pourra être appliquée à d'autres CYPs, est un outil utile qui permettra d'améliorer la compréhension et la prédiction pharmacocinétique et toxique de médicaments et d'autres produits chimiques.

Summary

Cytochromes P450 (CYPs) play a key role in the oxidative metabolism of many endogenous and exogenous compounds. The expression of CYPs is extremely variable depending on pathophysiological, genetic and environmental factors. The metabolism of xenobiotics by CYPs depends on the nature the quantity and the activity of CYP isoforms involved.

Quantitative analysis of CYP expression in organs such as liver, are of particular importance since the biotransformation performed by CYPs is often a critical factor that affects the efficiency, availability and drug toxicity in humans.

The most common technique is the immune-quantitation (Western Blot). This technique is limited by the availability and specificity of the antibody. Mass spectrometry-based proteomics, able to analyze very small amounts of protein in a mixture, are the methods of choice for identification and quantification of CYPs in different organs.

We developed and validated a method for dosing 6 CYPs (1A2, 2C9, 2D6, 2J2, 3A4 and 3A5) by liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

This simple, rapid, low-cost method has an adequate sensitivity, and has been validated in different types of biological matrices (liver and neuronal cell lines, baculosomes). It has been applied at large-scale to analyze these 6 CYPs in 50 human livers samples (microsomes and mitochondria) to study the phenotype/genotype relationship.

This method, which could easily be applied to other CYPs, provides an important tool to improve the understanding and prediction of pharmacokinetics and toxicity profile of drugs and other chemicals.

Remerciements

Cette thèse a été effectuée au sein de l'unité INSERM UMR-S 1147, "MEPPOT" "Médecine Personnalisée, Pharmacogénomique et Optimisation Thérapeutique" de l'Université Paris Descartes. Je tiens à remercier le directeur, Monsieur le Professeur Pierre Laurent-Puig, pour m'avoir accueilli au sein de cette unité.

Je remercie mes deux rapporteurs, Madame le Docteur Emmanuelle Leize-Wagner et Monsieur le Professeur André Guillouzo pour avoir accepté notre invitation à juger ce travail de thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture critique de ce document.

Merci

A Monsieur le Professeur Philippe Beaune, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans ton équipe "Metox", pour ton confiance et ton soutien permanent pour aboutir à ces résultats. Merci pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ma thèse et pour ta disponibilité et ton écoute malgré ton emploi du temps très chargé.

A Monsieur le Professeur Olivier Laprévote, pour m'avoir fait confiance en me proposant avec Philippe ce projet, pour ta participation critique à ce travail et pour être président de mon jury.

A Monsieur le Docteur Alain Brunelle, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe de spectrométrie de masse à l'ICSN, pour ton soutien humain tout au long de mon séjour à l'ICSN, et pour ton regard critique sur les posters, présentations et publications.

A Monsieur le Docteur David Touboul, mon encadrant, pour m'avoir fait profiter de tes très grandes qualités scientifiques et humaines tout au long de mon séjour à l'ICSN. Merci pour tes conseils de très grande qualité, qui ont conduit à la réussite de ce travail.

A Monsieur Jean-Pierre Le Caër, pour ton soutien et ta disponibilité tout au long de mon séjour à l'ICSN, pour ton grande expertise en protéomique et tes précieux conseils qui ont fortement participé à la réussite de ce travail.

A Madame Isabelle Schmitz-Afonso, pour ta disponibilité et ton écoute toujours immédiates, pour m'avoir fait profiter de tes grandes compétences en chromatographie et en spectrométrie de masse afin de réaliser un travail de haute qualité.

A Madame Catherine Marchetti et Monsieur Jean-Pierre Flinois, pour votre soutien et votre disponibilité et pour avoir participé à ce travail.

A Madame le Docteur Isabelle De Waziers, pour ta gentillesse, ton soutien et ton aide professionnelle et personnelle.

A Madame le Docteur Marie-Anne Lorient, pour ta gentillesse et tes conseils dans le domaine de pharmacogénomique.

Vincent, Nicolas, Olinda, Manuela, David, pour votre gentillesse et la bonne humeur qui rend cette équipe si vivante.

A tous les doctorants, post-doctorants et stagiaires passés et présents de la « France d'en-bas », Quentin, Marie M, Natacha, Mathieu, Marie T, Manale, Claudia, Sijia, Anaïs pour votre soutien et pour les bons moments que l'on a passé ensemble dans ce lieu de partage humain et scientifique.

A Paul et Hanane, pour votre soutien, votre bonne humeur et pour votre aide chaleureuse pendant la rédaction de cette thèse.

A l'ensemble de l'unité "MEPPOT" particulièrement à Mary, Céline, Anne, Alice pour votre participation à ce travail, à Marc pour ton aide en statistique, à Ikrame, Laurent, Heng, Iadh, Aurélie, Karine, Claire, Delphine, Audry, Corinne, Catherine, Mylène, pour votre gentillesse et votre soutien.

A Walid, pour toutes nos discussions sur le déroulement de nos thèses respectives et pour avoir été à l'écoute quand j'en avais besoin.

A mes amis syriens, Ali, Maan, Moutaz, Nicolas, pour avoir été toujours à côté de moi quand j'en avais besoin.

Enfin, une pensée concerne bien évidemment ma famille et tous mes amis en Syrie, qui m'ont toujours soutenu « de lointaine » dans mes projets, et sans qui cette aventure n'aurait pas été réalisable.

Table des matières

Le dosage des cytochromes P450 (CYPs) humains par Spectrométrie de Masse : applications en toxicologie	1
Résumé	2
Summary	2
Remerciements	3
Liste des abréviations	9
I. Introduction.....	11
1. CYPs description et implications en toxicologie.....	12
1.1 Découverte et portée du champ de recherche	12
1.2 Nomenclature.....	14
1.3 Localisation intracellulaire des CYPs	14
1.4 Structure.....	16
1.5 Mécanisme d'action des CYPs	17
1.5.1 Réactions catalysées par les CYPs	17
1.5.2 Le cycle catalytique des CYPs	18
1.5.3 Chaînes de transfert des électrons associées aux CYPs	19
1.6 Le rôle biologique des CYPs.....	20
1.6.1 Les substrats des CYPs.....	20
1.6.2 Intégration des CYPs dans le métabolisme des xénobiotiques	23
1.7 Variabilité d'expression des CYPs	25
1.7.1 Facteurs endogènes	26
1.7.2 Facteurs exogènes (xénobiotiques).....	30
1.8 Conséquences du métabolisme des xénobiotiques par les CYPs.....	34
1.8.1 Elimination.....	34
1.8.2 Activation.....	34
1.8.3 Interactions médicamenteuses	34
1.9 Le rôle des CYPs en toxicologie	35
2. Quantification de protéines en biologie.....	38
2.1 Dosage de protéines par Spectroscopie d'absorption ultraviolet.....	38
2.2 Dosage colorimétrique	39
2.3 Gel électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) ou (2D)	40
2.4 Méthodes immunologiques	41
2.4.1 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	42
2.4.2 Western Blot (WB).....	45

2.5 RT-qPCR	47
2.6 Activité enzymatique.....	47
2.7 Dosage de protéines par spectrométrie de masse	49
2.7.1 Marquage métabolique.....	50
2.7.2 Marquage chimique	51
2.7.3 Marquage enzymatique (^{18}O).....	56
2.7.4 Couplage immunochimie-MS	57
2.7.5 Dilution par des isotopes stables	58
2.7.6 Quantification sans marquage (label-free)	60
2.7.7 Modes d'acquisition en spectrométrie de masse utilisés pour la quantification des protéines	63
2.8 Méthodes de dosage des CYPs.....	64
2.8.1 L'état de l'art	64
2.8.2 Evolution de l'état de l'art au cours de ces 3 dernières années.....	72
3. Technologies LC-MS	73
3.1 La chromatographie liquide (LC)	73
3.1.1 HPLC.....	73
3.1.2 UPLC.....	75
3.1.3 Nano-LC	75
3.2 Spectrométrie de masse.....	75
3.2.1 Présentation générale	75
3.2.2 Les sources d'ionisation	76
3.2.3 Les analyseurs.....	79
3.2.4 Le détecteur	87
3.3 Modes d'acquisition en spectrométrie de masse utilisés pour la quantification des protéines	88
3.3.1 Le mode 'Data Dependant Acquisition' (DDA)	88
3.3.2 Le mode ciblé (SRM, selected reaction monitoring)	88
3.3.3 Le mode MRM cube (MRM ³)	89
3.3.4 Le mode de fragmentation parallèle (MS ^E)	89
3.3.5 Le mode SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra)	89
3.3.6 Le mode PRM (Parallel reaction Monitoring).....	90
II. But du travail	91
III. Matériels et Méthodes.....	92
1. Réactifs chimiques et biologiques	93
2. Baculosomes.....	93
3. Les lignées cellulaires hépatiques HepG2	93

3.1 Adénovirus recombinants (Ad).....	93
3.2 Lentivirus recombinants (LV).....	94
4. Microsomes de foies humains.....	94
5. Western Blot.....	95
6. Activités enzymatiques.....	96
7. RT-qPCR	98
Extraction des ARN totaux.....	98
Transcription inverse (RT)	98
Amplification d'ADNc par qPCR.....	98
8. Méthode d'analyse LC-MS.....	99
8.1 Solutions-mères.....	99
8.2 Solutions de travail	100
8.3 L'étalon interne	100
8.4 La digestion trypsique	101
8.5 Paramètres LC-MS	101
IV. Résultats.....	109
1. Mise en place d'une méthode de dosages des CYPs par spectrométrie de masse	110
1.1 Sélection des peptides protéotypiques.....	110
1.1.1 Revue de la littérature sur la sélection des peptides protéotypiques*	110
1.1.2 Méthodologie appliquée	112
1.2 Comparaison de la sensibilité des analyseurs triple-quadripôle et hybrides quadripôle/ temps-de-vol*	116
1.3 Optimisation de la digestion trypsique	119
1.3.1 Digestion en gel ou en solution	119
1.3.2 Utilisation de détergents.....	120
1.3.3 Le type de trypsine	121
1.3.4 La durée de la digestion	122
1.3.5 La digestion complète	122
1.4 Linéarité de la méthode MRM dans les échantillons biologiques et l'étape d'ajout des PPs standards	123
1.4.1 Linéarité de l'expression des CYPs dans les cellules HepG2.....	123
1.4.2 Linéarité par ajout de PP dans des échantillons de foie humain	124
1.5 Evaluation de l'étape d'ajout des peptides protéotypiques standards	125
1.5.1 Foie humain	125
1.5.2 Cellules HepG2	126
1.6 Problèmes expérimentaux*	127

1.6.1 Effet de l'alkylation par l'iodoacetamide sur les peptides ajoutés avant la digestion	127
1.6.2 Problème de compatibilité des flacons en polypropylène avec la chaîne Accela	134
1.6.3 Problèmes rencontrés au niveau de l'acquisition	134
1.6.4 Problème de collage (adsorption) de certains peptides	135
1.7 Détermination de la quantité de protéines injectées*	137
1.8 Gammes d'étalonnage réalisées dans différentes matrices	139
1.9 Validation de la méthode	140
1.10 Quantification des CYPs dans les cellules HepG2	142
1.11 Quantification des CYPs dans les baculosomes	143
1.12 Dosage du CYP2U1 dans des lignées cellulaires neuronales humaines SH SY-5Y*	144
1.12.1 Introduction (importance du CYP2U1)	144
1.12.2 Préparation des échantillons biologiques	144
1.12.3 Résultats	145
1.12.4 Discussion	158
1.12.5 Quantification du CYP2U1 dans la lignée SH par UPLC-TQ	162
1.13 Publication 1	165
1.13.1 Introduction	165
1.13.2 Publication 1	166
1.13.3 Conclusion	198
2. Applications biologiques dosage des CYPs chez l'Homme	202
2.1 Dosage dans le foie des CYPs 1A2, 2D6, 2C9, 2J2, 3A4 et 3A5 dans le foie humain	202
2.1.1 Introduction	202
2.1.2 Projet de Publications 2	203
2.1.3 Conclusion	239
V. Conclusions et perspectives	240
VI. Références bibliographiques (sites web et articles)	243
1. Sites web	243
2. Articles	243

Liste des abréviations

2D : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle	FMOs : Flavines monooxygénases
2D-DIGE : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle différentielle	GF: glu-fibrinopeptide
Ac : Anticorps	GH : Hormone de croissance
ACN : Acétonitrile	GST : Glutathion-S-transférase
Ad : Adénovirus recombinants	HAPs : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
ADME : Absorption, distribution, métabolisation et élimination	HIV: Virus de l'immunodéficience humaine
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire	HPLC: Chromatographie liquide haute performance
AF : Acide formique	HRP: Horseradish peroxydase
AhR : Aryl hydrocarbon receptor	HSA : Albumine de sérum humain
AQUA: Peptide pour la quantification absolue	HT : Homogénats totaux
ARNm: Acide ribonucléique messenger	IAA: Iodoacétamide
BCA : Acide bicinchoninique	ICAT: Isotope-coded affinity tags
BSA : Sérum albumine bovine	ICPL : Isotope-coded protein label
CV : Coefficient de variation	ICP-MS: Spectrométrie de masse par torche à plasma
CYP: Cytochrome P450	IS : Étalon interne
DDA : Mode 'Data Dependant Acquisition'	iTRAQ: Isobaric tag for relative and absolute quantitation
DIA : Mode 'Data Independent Acquisition'	LC: Chromatographie liquide
DTT : Dithiotreitol	LV : Lentivirus recombinants
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique	LOD: Limite de détection
EIC : Chromatogramme d'ion extrait	LOQ: Limite de quantification
ELISA: Test d'immunoabsorption enzymatique (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	<i>m/z</i> : Rapport masse sur charge
emPAI: Exponentially Modified Protein Abundance Index	MALDI : La désorption/ionisation laser assistée par matrice
ESI: Ionisation par electrospray	MeCAT: Metal-Coded affinity Tagging
FAD: Flavine-adénine dinucléotide	Mic: Microsome
FdR: Ferrédoxine réductase	Mito : Mitochondrie
Fdx: Ferrédoxine	MOI : Multiplicité d'infection (Multiplicity Of Infection)
FMN: Flavine mononucléotide	MPTs : Modifications post-traductionnelle

MRM: Multiple Reaction Monitoring	ROS : Espèces réactives de l'oxygène
MR _S : Ratio métabolique	RQI : RNA Quality index
MS : Spectromètre de masse	S/N : Rapport signal sur bruit
MS/MS, MS ⁿ : Spectrométrie de masse en tandem (n=2) ou multidimensionnelle	SC : Comptage de spectres
MS ^E : Le mode de fragmentation parallèle	SDC : Deoxycholate de sodium
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	SDS : Dodécyl sulfate de sodium
Pa : Pascal	SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
PAI : Index d'abondance de protéine	SH: Lignée SH-SY5Y
p-BPB : 2 -bromo-4'-bromacétophénone	SILAC: Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture
p-CPB : 2-bromo-4'-chloroacétophenone	SILAM: Stable isotope labeling of mammals
P-gp: P-glycoprotéine	SIM: Single Ion Monitoring
PMF: Empreinte peptidique massique (peptide mass fingerprinting)	SISCAPA: Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies
POR : NADPH-CYP réductase	SNP: Polymorphisme nucléotidique (single-nucleotide polymorphism)
PP : Peptide protéotypique	SRM: Single/Selected Reaction Monitoring
PRM : Parallel Reaction Monitoring	SWATH: 'Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra' mode
PSAQ: Protein Standard Absolute Quantification	TFA: Acide trifluoroacétique
Psi: Livre par pouce carré (pound per square inch)	Th: Thomson
PXR: Pregnane X receptor	TMT: Tandem mass tags
Q : Quadripôle	TOF: Time-Of-Flight (Temps de vol)
QconCAT: Concatamère pour la Quantification	TQ : Triple quadripôle
qPCR: Réaction en chaîne par polymérase quantitative	uma: Unité de masse atomique
R : Résolution en masse	UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography
rCYP : CYP recombinants	UV : Ultraviolet
RE : Réticulum endoplasmique	WB: Western Blot

I. Introduction

1. CYPs description et implications en toxicologie

1.1 Découverte et portée du champ de recherche

Cela fait maintenant plus d'une demi-siècle que Klingenberg et Garfinkel (1958) ont signalé pour la première fois l'observation d'un pigment jaune orangé dans des fractions microsomales hépatiques de rat et de cochon qui, réduit par du dithionite ou du NADPH, présentait une absorption caractéristique à 450 nm en présence de monoxyde de carbone (CO) (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958). La nature de ces pigments a été identifiée grâce aux travaux d'Omura et Sato, en montrant qu'il s'agissait d'hémoprotéines, qui seront connues plus tard sous le nom de « cytochrome P450 » signifiant Pigment absorbant à 450 nm (Omura and Sato, 1962, 1964a). Le rôle des cytochromes P450 (**CYPs**) dans la biosynthèse (hydroxylation) des stéroïdes puis dans le métabolisme oxydatif de médicaments et d'autres composés exogènes a été démontré au cours des années 60s (Estabrook *et al.*, 1963; Cooper *et al.*, 1965). La présence des CYPs dans les mitochondries a été découverte en 1964 (Harding *et al.*, 1964). Au début des années 70s, le cycle catalytique des CYPs a été proposé (Estabrook *et al.*, 1971) et le rôle des CYPs dans la formation des intermédiaires réactifs a été confirmé (Jerina *et al.*, 1970; Selkirk *et al.*, 1971). Après avoir purifié le premier CYP dans la bactérie (Katagiri *et al.*, 1968), D. Ryan, *et al.* ont réussi à solubiliser et purifier le CYP dans les microsomes de foie de rat au milieu des années 70s (Ryan *et al.*, 1975). La séquence d'un CYP et le clonage de son ADNc a été établi pour la première fois au début des années 80 (Fujii-Kuriyama *et al.*, 1982). Le clonage d'ADNc des différents CYPs a ouvert la porte au développement des méthodes d'expression hétérologues de CYPs dans la levure (Oeda *et al.*, 1985), dans les cellules d'insectes (baculovirus) (Asseffa *et al.*, 1989), dans les bactéries (Larson *et al.*, 1991) et dans les cellules de mammifères (Clark and Waterman, 1991).

Depuis ces découvertes, la recherche dans le domaine des CYPs a été très active (Figure 1) et a permis une bonne compréhension du fonctionnement, du rôle et de la régulation des CYPs dont les principaux éléments vont être décrits.

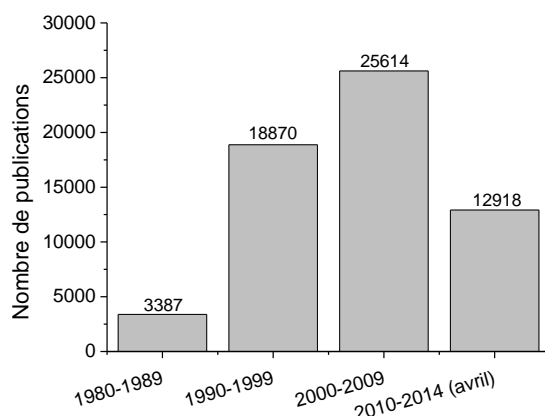


Figure (1) Nombre de publications dans le domaine des CYPs entre 1980 et avril 2014. (Web of science™ [v.5.13.2], visité le 14 avril 2014).

Les CYPs constituent une superfamille d'hémoprotéines qui sont ubiquistes dans la nature (Omura, 2011). La Figure (2) montre les nombreux domaines dans lesquels ces CYPs jouent un rôle, soulignant ainsi leur importance dans plusieurs branches de la biologie.

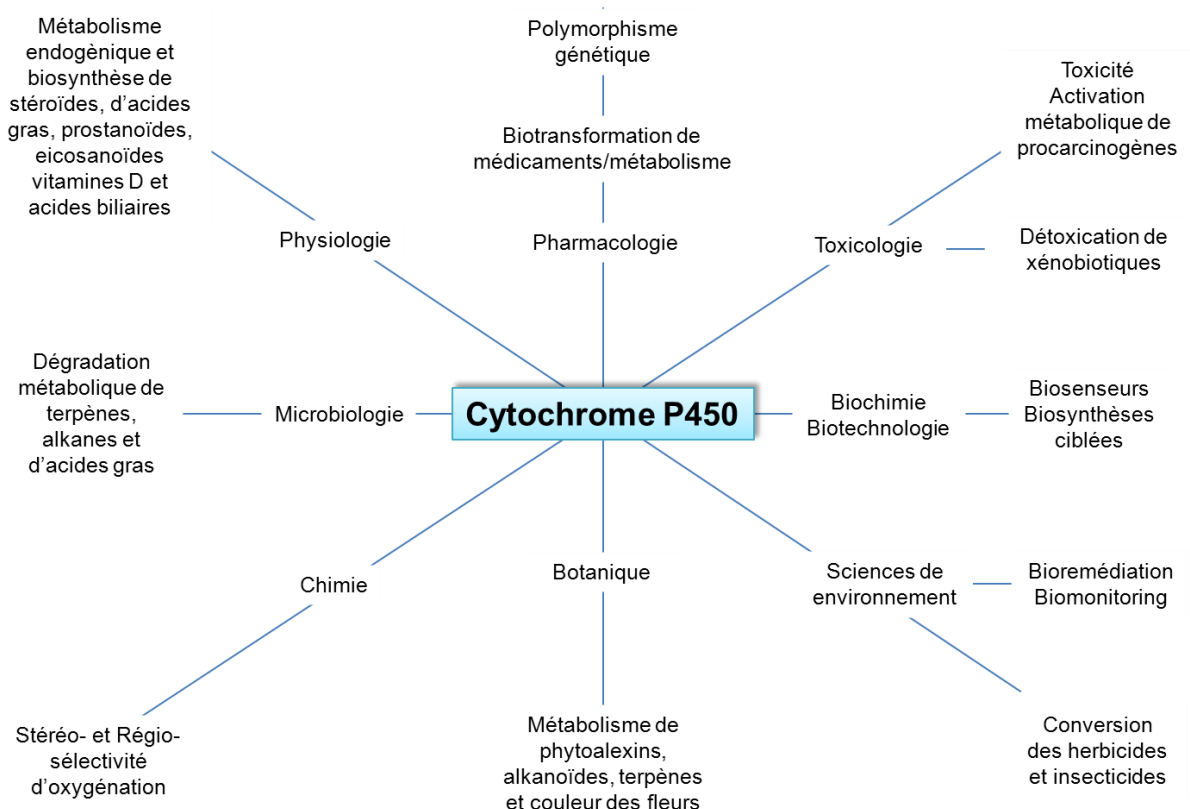


Figure (2) Domaines de recherches des CYPs et champs d'application ((Lewis, 2001) adapté de (Bernhardt, 1996))

1.2 Nomenclature

Avant 1987, les CYPs animaux et humains purifiés à partir de tissus ont été décrits par différents systèmes de nomenclature particulière au laboratoire comme les systèmes basés sur leurs activités catalytiques, leurs propriétés chromatographiques ou leurs variations d'expression selon les inducteurs. Suite à l'augmentation du nombre des CYPs découverts et la disponibilité des séquences nucléotidiques, une classification des CYPs en familles et sous-familles, fondée sur la similitude des séquences primaires des acides aminés, a été proposée (Nebert *et al.*, 1987). Pour que deux CYPs soient membres d'une même famille, leur homologie de séquence doit être supérieure à 40 % ; pour une même sous-famille, elle doit dépasser 55 %. Pour la nomenclature, la famille est indiquée par un chiffre arabe suivi d'une lettre majuscule correspondant à la sous-famille, puis un chiffre arabe identifiant l'isoforme (Figure 3). Enfin, les isoformes ayant moins de 3% de différence de séquence sont classés comme variantes alléliques (<http://www.cypalleles.ki.se>). Le génome humain contient 57 gènes (18 familles et 42 sous-familles) de CYPs dont sept (trois familles) codant les CYPs mitochondriaux. La forme italique est utilisée quand il fait référence au gène : *CYP3A4*.

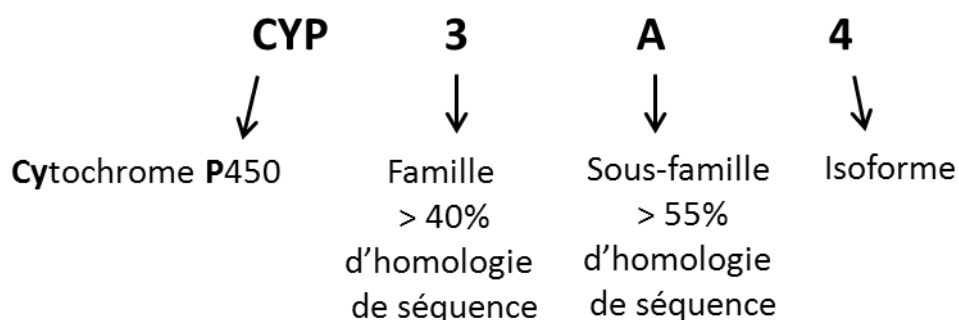


Figure (3) Nomenclature des cytochromes P450 (e.g. CYP3A4)

1.3 Localisation intracellulaire des CYPs

Les CYPs microsomaux sont synthétisés par les ribosomes liés aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) rugueux et incorporés simultanément dans la membrane du RE. D'autre part, les CYPs mitochondriaux sont synthétisés par les polysomes libres dans le cytoplasme puis sont adressés de manière sélective à la membrane interne des mitochondries. La destination des CYPs vers le RE ou la mitochondrie est déterminé par la séquence de ciblage (targeting sequence) dans la partie terminale de l'apoprotéine (Omura, 2006). Le tableau (1) regroupe les 57 CYPs humains.

Tableau (1) Les 57 CYPs humains, leurs localisations et leurs activités caractéristiques.
D'après ((Guengerich, 2005a; Lewis and Ito, 2010; Preissner *et al.*, 2013)

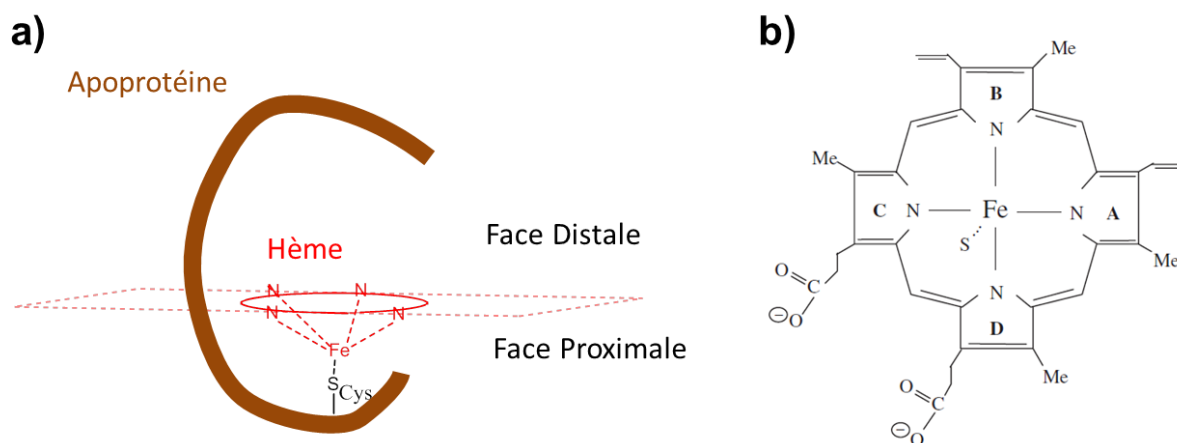
CYP	Tissus d'expression principaux	Localisation cellulaire	Activité caractéristique
1A1	Poumons, extra hépatiques	RE	3-hydroxylation du benzo[α]pyrène
1A2	Foie	RE	<i>N</i> -déméthylation de la caféine
1B1	Poumons, reins	RE	4-hydroxylation du 17 β -estradiol
2A6	Foie, poumons	RE	7-hydroxylation de la coumarine
2A7	Hypophyse	RE	7-hydroxylation de la coumarine
2A13	Muqueuse nasale	RE	α -méthylène hydroxylation de la NNK
2B6	Foie, poumons	RE	<i>N</i> -déméthylation de la (S)-mephenytoine
2C8	Foie	RE	6a-hydroxylation du taxol
2C9	Foie	RE	4'-hydroxylation du diclofénac
2C18	Foie	RE	<i>N</i> -déméthylation de l'antipyrine
2C19	Foie	RE	4'-hydroxylation de la (S)-mephenytoine
2D6	Foie	RE	4-hydroxylation de la débrisoquine
2E1	Foie, poumons	RE	6-hydroxylation de la chlozoxazone
2F1	Poumons	RE	activation du 3-méthylindole
2J2	Poumons	RE	hydroxylation de l'ébastine
2R1	Seins	RE	25-hydroxylation de la vitamine D ₃
2S1 ^a	Poumons	RE	peroxydation et isomérisation des eicosanoïdes
2U1 ^b	Thymus, cerveau	RE	hydroxylation d'acides gras (acide arachidonique)
2W1 ^c	Muqueuse pharyngée	RE	hydroxylation d'acides gras (lysophosphatidylcholine)
3A4	Foie, intestin grêle	RE	6 β -hydroxylation de la testostérone
3A5	Foie, poumons	RE	6 β -hydroxylation de la testostérone
3A7	Foie fœtal	RE	6 β -hydroxylation de la testostérone
3A43	ARNm (gonads, cerveau ^d)	RE	6 β -hydroxylation de la testostérone
4A11	Foie	RE	ω -hydroxylation d'acides gras
4A22		RE	
4B1	Poumons	RE	ω -hydroxylation de l'acide laurique
4F2	Foie	RE	ω -hydroxylation du leucotriène B ₄
4F3	Neutrophiles	RE	ω -hydroxylation du leucotriène B ₄
4F8	Vésicules séminales	RE	ω -2-hydroxylation de prostaglandines
4F11	Foie	RE	
4F12	Foie	RE	ω , ω -2-hydroxylation de l'acide arachidonique
4F22	Cavité buccale	RE	
4V2 ^e	Cortico-surrénales	RE	ω -hydroxylation d'acides gras
4X1	Prostate, bronche	RE	
4Z1		RE	
5A1	Plaquettes	RE	synthèse du thromboxane A ₂
7A1	Foie	RE	7 α -hydroxylation du cholestérol
7B1	Cerveau	RE	7 α -hydroxylation de la déhydroepiandrosterone
8A1	Aorte	RE	isomérisation de prostaglandine H ₂ en PGI ₂
8B1	Foie	RE	12 α -hydroxylation de 7 α -hydroxyprogesterone
11A1	Glandes surrénales	Mito	coupure de chaînes latérales du cholestérol
11B1	Glandes surrénales	Mito	11-hydroxylation du 11-desoxycortisol
11B2	Glandes surrénales	Mito	18-hydroxylation de la corticostérone
17A1	Tissus stéroïdogènes	RE	17 α -hydroxylation de stéroïdes
19A1	Tissus stéroïdogènes, cerveau	RE	aromatisation de l'androstènedione
20A1		RE	
21A2	Tissus stéroïdogènes	RE	21-hydroxylation de la 17-hydroxyprogesterone
24A1	Reins	Mito	24-hydroxylation de la 25-hydroxyvitamine D ₃
26A1		RE	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque
26B1	Cerveau	RE	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque
26C1 ^f		(RE?)	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque
27A1	Foie	Mito	27-hydroxylation de stérols
27B1	Reins	Mito	1-hydroxylation de la vitamine D ₃
27C1		(Mito)	
39A1	Foie	RE	7 -hydroxylation du 24-hydroxycholestérol
46A1	Cerveau	RE	24-hydroxylation du cholestérol
51A1	Foie, testicules	RE	14 α -déméthylation du lanostérol

RE: Réticulum endoplasmique, Mito: Mitochondrie. NNK : 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, ARNm : Acide ribonucléique messenger, ^a(Bui *et al.*, 2011), ^b(Devos *et al.*, 2010), ^c(Xiao and Guengerich, 2012), ^d(Agarwal *et al.*, 2008), ^e(Nakano *et al.*, 2009, 2012), ^f(Helvig *et al.*, 2011)

1.4 Structure

Tous les CYPs identifiés à ce jour désignent des protéines hème-thiolates se composant d'une apoprotéine reliée de façon non covalente au fer d'une molécule d'hème par le groupement thiol d'un résidu cystéine (Figure 4). L'apoprotéine est une chaîne polypeptidique d'environ 500 acides aminés et de masse moléculaire comprise entre 45 et 62 kDa. Le résidu cystéine qui permet la liaison hème-apoprotéine est situé dans la partie C-terminale de l'apoprotéine. La partie N-terminale quant à elle permet l'ancrage de la protéine aux membranes du réticulum endoplasmique lisse des fractions microsomales des hépatocytes grâce à sa richesse en acides aminés hydrophobes (résidus de 20 à 40). En revanche, les CYPs bactériens sont cytosoliques et les 20 à 40 résidus hydrophobes de la partie N-terminale sont absents. Dans les mitochondries, les CYPs sont associés à la face intérieure de la membrane mitochondriale interne par des interactions hydrophobes avec la région entre les hélices F et G (Headlam *et al.*, 2003).

L'hème des CYPs est constitué d'une protoporphyrine IX de Fer. Ce métal est lié aux quatre azotes pyrroliques de la porphyrine et au groupement thiolate de la cystéine axiale en cinquième coordination. Le fer peut avoir une sixième liaison de coordination avec diverses molécules comme H_2O (Fe^{3+}) et CO , ou O_2 (Fe^{2+}). Dans le CYP, on distingue deux régions séparées par le plan de l'hème : la face proximale située du côté du ligand cystéinate et la face distale ; une partie constitutive du site actif de l'enzyme (Figure 4). La figure (5) représente la structure du CYP2B6.



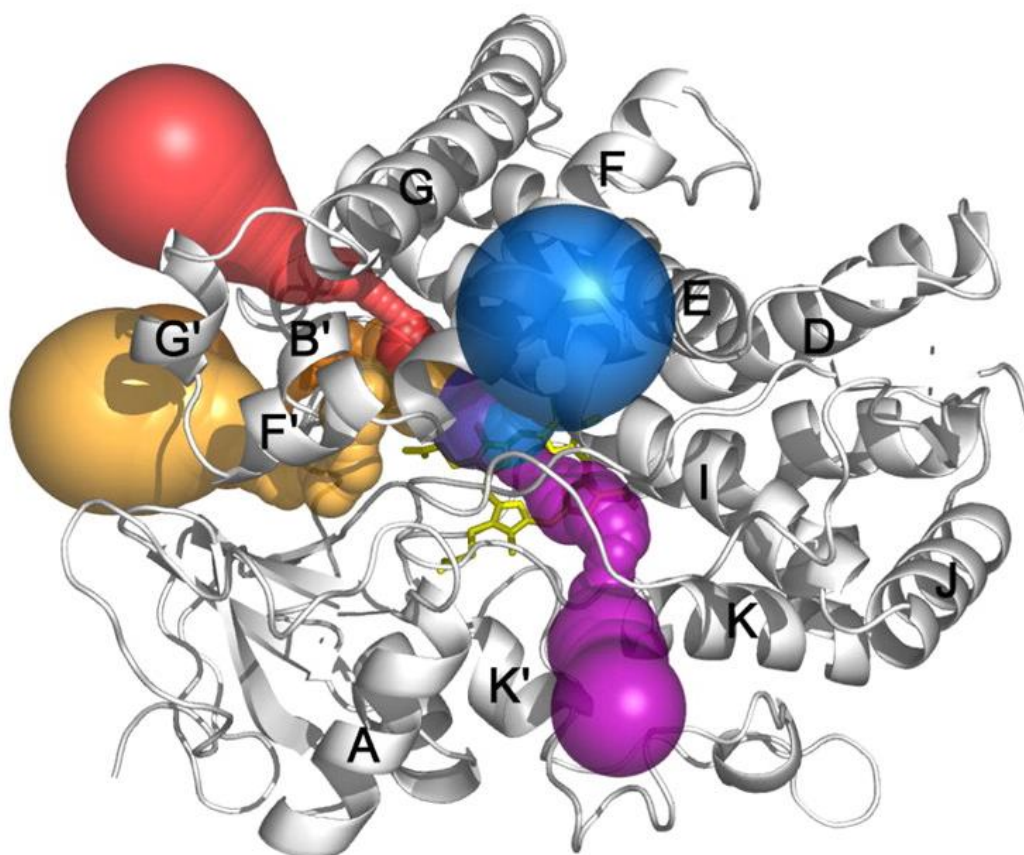


Figure (5) Structure générale du CYP2B6 avec les canaux d'entrée des substrats.

L'hème est situé au centre de la structure (en jaune) (Nguyen *et al.*, 2008).

1.5 Mécanisme d'action des CYPs

1.5.1 Réactions catalysées par les CYPs

Chaque isoforme de CYPs catalyse un certain nombre de réactions chimiques dépendant de la structure de l'apoprotéine. La capacité de lier et de métaboliser un grand nombre de substrats de classes chimiques variées par des réactions diverses est une caractéristique fondamentale de l'activité des CYPs. Les réactions catalysées par les CYPs sont principalement des réactions de mono-oxygénation, dont les hydroxylations et les époxydations sont les plus connues (Figure 6)

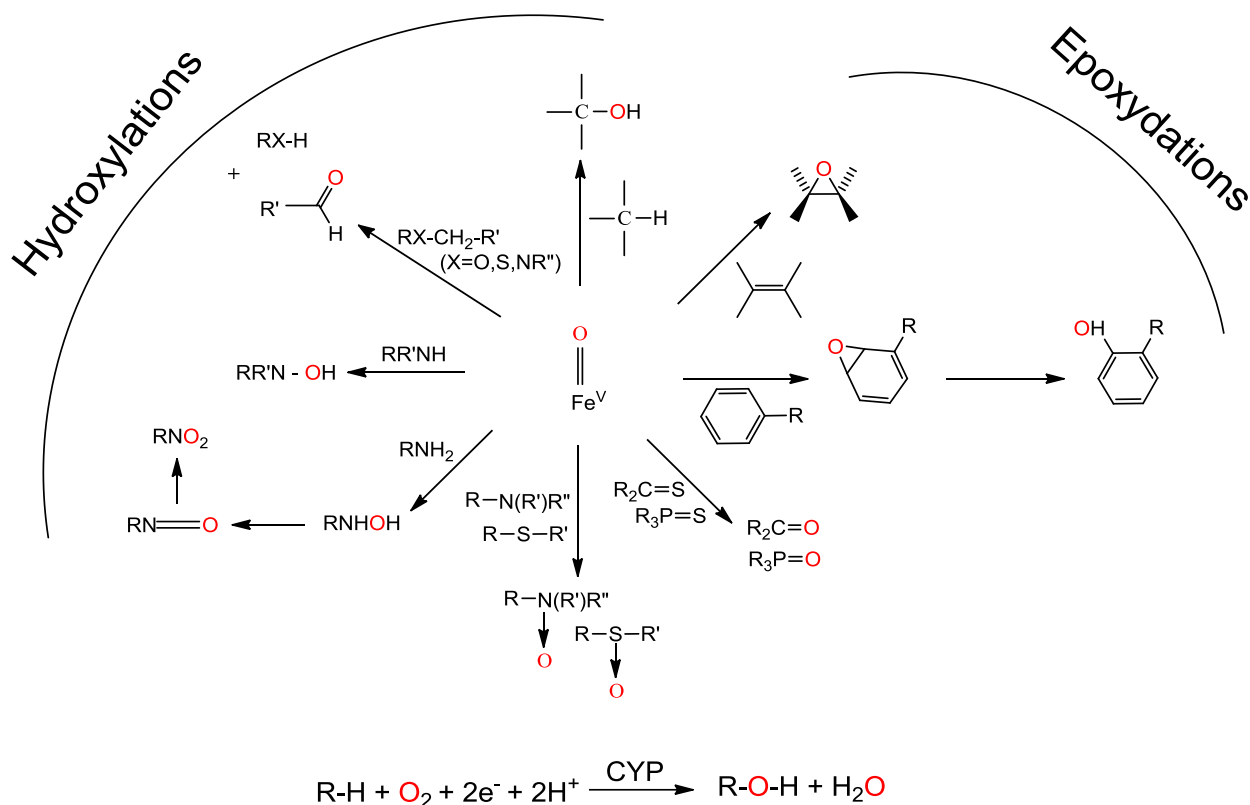
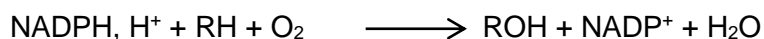


Figure (6) Réactions d'oxydation généralement catalysées par les CYPs. D'après (Mansuy and Battioni, 2000)

D'autres réactions, comme des réductions, des déshydratations, des isomérisations et des réactions de réarrangement ont aussi été identifiées (Guengerich and Munro, 2013).

1.5.2 Le cycle catalytique des CYPs

La réaction générale catalysée par les CYPs est la réaction de mono-oxygénation suivante :



Le CYP transfère un atome d'oxygène moléculaire (O_2) sur le substrat et produira avec l'autre une molécule d'eau. Pour réaliser ces transferts, le CYP a besoin d'électrons qui vont réduire le fer de l'hème permettant la fixation de l'oxygène moléculaire. Ces électrons sont apportés par le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) au cours du cycle catalytique de l'enzyme (Isin and Guengerich, 2008).

Le NADPH-CYP réductase (POR) va permettre le transfert des 2 électrons du NADPH, le premier électron va permettre la fixation d'une molécule d' O_2 sur le fer en réduisant le Fe^{3+} à l'état Fe^{2+} . Le deuxième électron va entraîner la formation d'un complexe peroxo-ferrique qui, après l'apport de protons, va libérer une molécule d'eau. L'autre atome d'oxygène est ensuite transféré sur le substrat, ce qui termine le cycle et l'enzyme est de nouveau disponible pour une réaction de métabolisation (Figure 7).

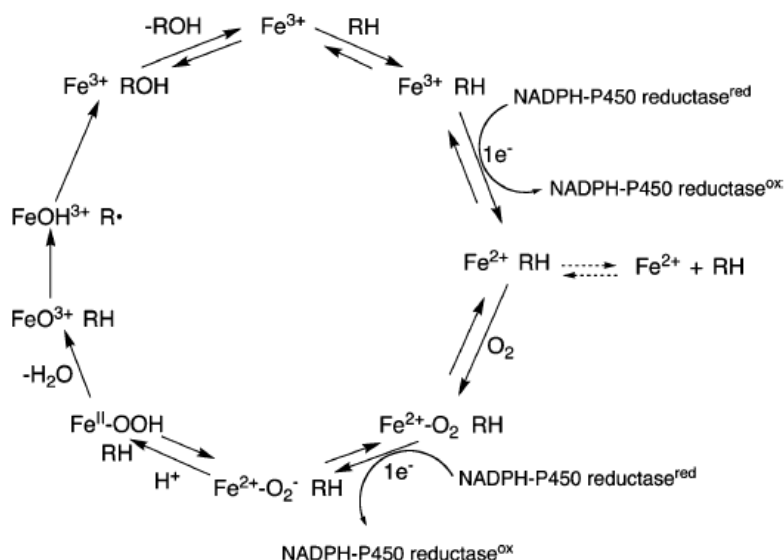


Figure (7) Le cycle catalytique des CYPs (Isin and Guengerich, 2008).

La première étape est la liaison du substrat RH suivie d'une réduction par électron. Après l'activation de l'hème par O_2 et une réduction par un deuxième électron, un atome d'oxygène est transféré au substrat conduisant à la formation du produit ROH . Au cours de ce cycle, les deux électrons sont transférés à partir de NADPH par la POR.

1.5.3 Chaînes de transfert des électrons associées aux CYPs

La majorité des réactions catalysées par les CYPs sont des mono-oxygénations qui permettent l'ajout d'un atome d'oxygène moléculaire sur un substrat. Cette réaction nécessite $2e^-$ qui sont transférés à partir du NADPH par une protéine partenaire : une réductase. Il y a deux types de protéines réductases distincts suivant la localisation microsomale ou mitochondriale des CYPs (Paine *et al.*, 2005; Hannemann *et al.*, 2007):

- La classe I comprend les CYPs mitochondriaux qui utilisent un système de transfert d'électrons à deux composants : ferrédoxine réductase (FdR) à flavine FAD (flavine-adénine dinucléotide) et une ferrédoxine (Fdx) à centre fer-soufre Fe_2S_2 . Les deux électrons, un par un, sont prélevés du NADPH par la FdR puis transmis à la Fdx qui

les transfère ensuite au CYP. Les FdR et Fdx sont associés avec la membrane interne de la mitochondrie (Mitani *et al.*, 1979; Hatano *et al.*, 1989).

- La classe II caractérise les CYPs microsomaux. La NADPH-CYP réductase (POR) dans cette classe comporte deux domaines contenant chacun une flavine (FAD et FMN : flavine mononucléotide). Ici, la POR est le seul intermédiaire entre le NADPH et le CYP. CYP et POR sont associés dans une membrane intracellulaire, notamment sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique (Figure 8).

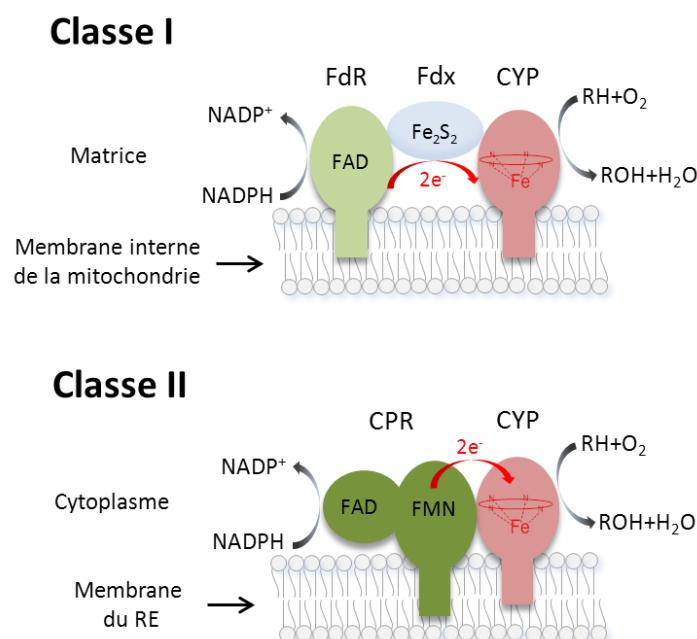


Figure (8) Les partenaires des CYPs dans la chaîne de transfert d'électrons.

La classe I comprend les CYPs mitochondriaux. La classe II comprend les CYPs microsomaux. Fdx : ferrédoxine, FdR : ferrédoxine réductase, POR : NADPH-CYP réductase. d'après (Paine *et al.*, 2005; Hannemann *et al.*, 2007).

1.6 Le rôle biologique des CYPs

1.6.1 Les substrats des CYPs

Une des caractéristiques des CYPs est le grand nombre et la diversité des classes chimiques de leurs substrats. Les 57 CYPs humains présentent un mélange de fonctionnalités à la fois exogènes et endogènes, comme le résume le tableau (2), où les différentes classes de substrats sont affichées.

Tableau (2) Classification* des 57 CYPs humains fondée sur leur principal substrat. Adapté de (Guengerich and Cheng, 2011).

Substrats exogènes	Substrats endogènes				Inconnu
Xénobiotiques	Stérols	Acides gras	Eicosanoïdes	Vitamines	Orphelins
1A1	1B1	2J2	4F2	24A1	4A22
1A2	7A1	4A11	4F3	26A1	4F11
2A6	7B1	4B1	4F8	26B1	4F22
2A13	8B1	4F12	5A1	27B1	4X1
2B6	11A1	2U1	8A1	2R1	4Z1
2C8	11B1	2W1	2S1	26C1	20A1
2C9	11B2	4V2			27C1
2C18	17A1				
2C19	19A1				
2D6	21A2				
2E1	27A1				
2F1	39A1				
3A4	46A1				
3A5	51A1				
3A7	3A43				
2A7					

* Cette classification est un peu arbitraire. Certains CYPs comme les CYP 1B1 et 27A1 peuvent être regroupés en deux catégories différentes.

1.6.1.1 Substrats endogènes

Les CYPs (essentiellement des familles 4 à 51) sont impliqués dans la biosynthèse et la métabolisation de composés endogènes comme le cholestérol, les acides biliaires, les acides gras, les hormones stéroïdiennes, les eicosanoïdes et les vitamines (McLean *et al.*, 2012; Nebert and Russell, 2002) (Figure 9). Les CYPs qui participent à cette voie endogène (dont les sept isoformes mitochondriaux) sont extraordinairement sélectifs pour leur propre substrat. Certains CYPs qui métabolisent les xénobiotiques peuvent avoir des fonctions endogènes (e.g. biotransformation d'acide arachidonique) (Figure 9.D).

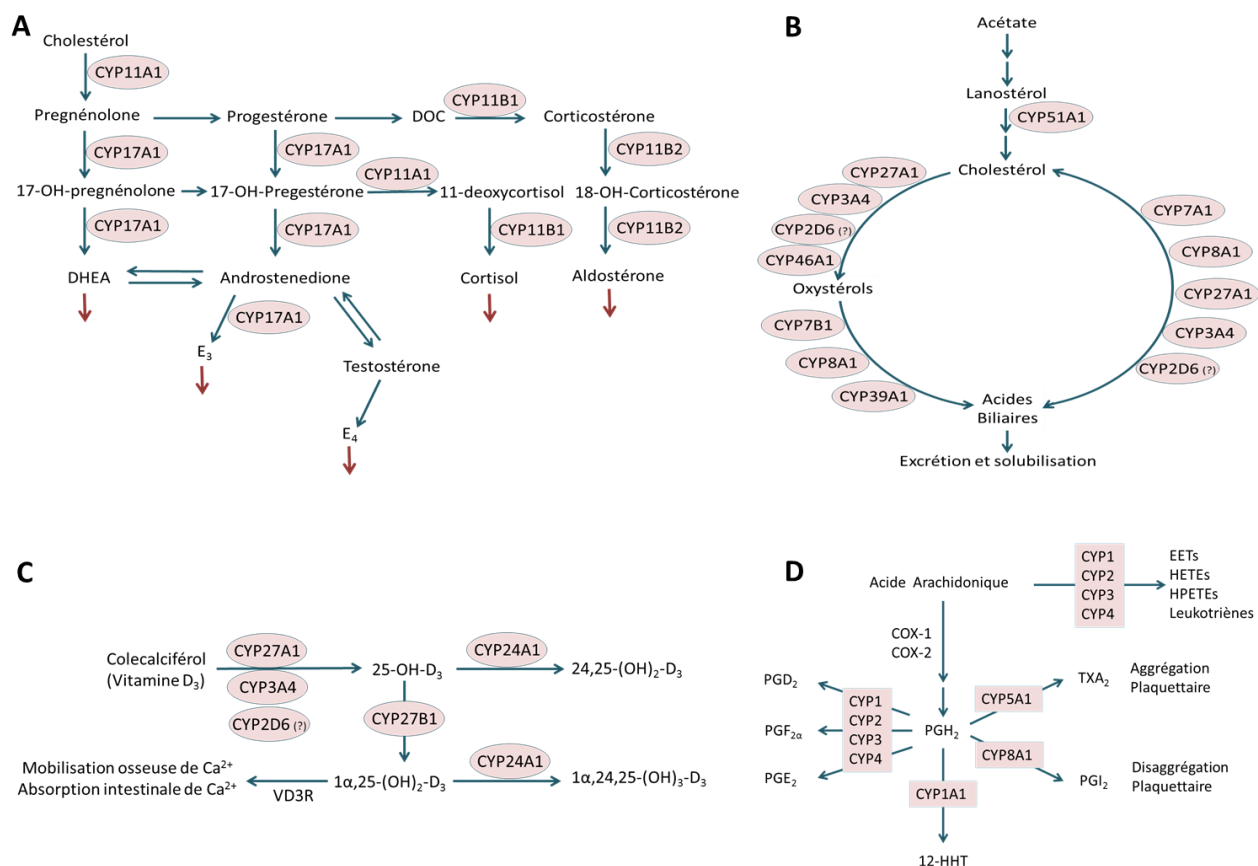


Figure (9) Les CYPs impliqués dans A. la biosynthèse des hormones stéroïdiennes B. la biosynthèse des acides biliaires C. la transformation de la vitamine D₃ D. la transformation des eicosanoïdes (Nebert and Russell, 2002).

1.6.1.1 Substrats exogènes : les xénobiotiques

Les CYPs sont impliqués dans la métabolisation des substances étrangères à l'organisme, dit xénobiotiques, comme des médicaments, des polluants atmosphériques, des composés d'origine alimentaire. Les CYPs impliqués dans l'oxydation des xénobiotiques sont principalement les membres des familles 1, 2 et 3. Au contraire des CYPs ayant des activités endogènes, ces isoformes ont un large spectre d'activité non spécifique. Par exemple, le CYP3A4 est capable de métaboliser structuellement divers xénobiotiques dont plus de 1000 sont actuellement connus (Rendic, 2002).

L'homme est exposé constamment et inévitablement aux xénobiotiques qui peuvent avoir des effets néfastes selon leur interaction avec l'organisme ; absorption, distribution, métabolisation et élimination (ADME) (Figure 10). Ces substances sont des molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 1000 Da), généralement hydrophobes et/ou ayant des groupements chimiques réactifs. L'élimination ou la neutralisation de ces composés est une étape cruciale dans la défense de l'organisme contre leur toxicité potentielle.

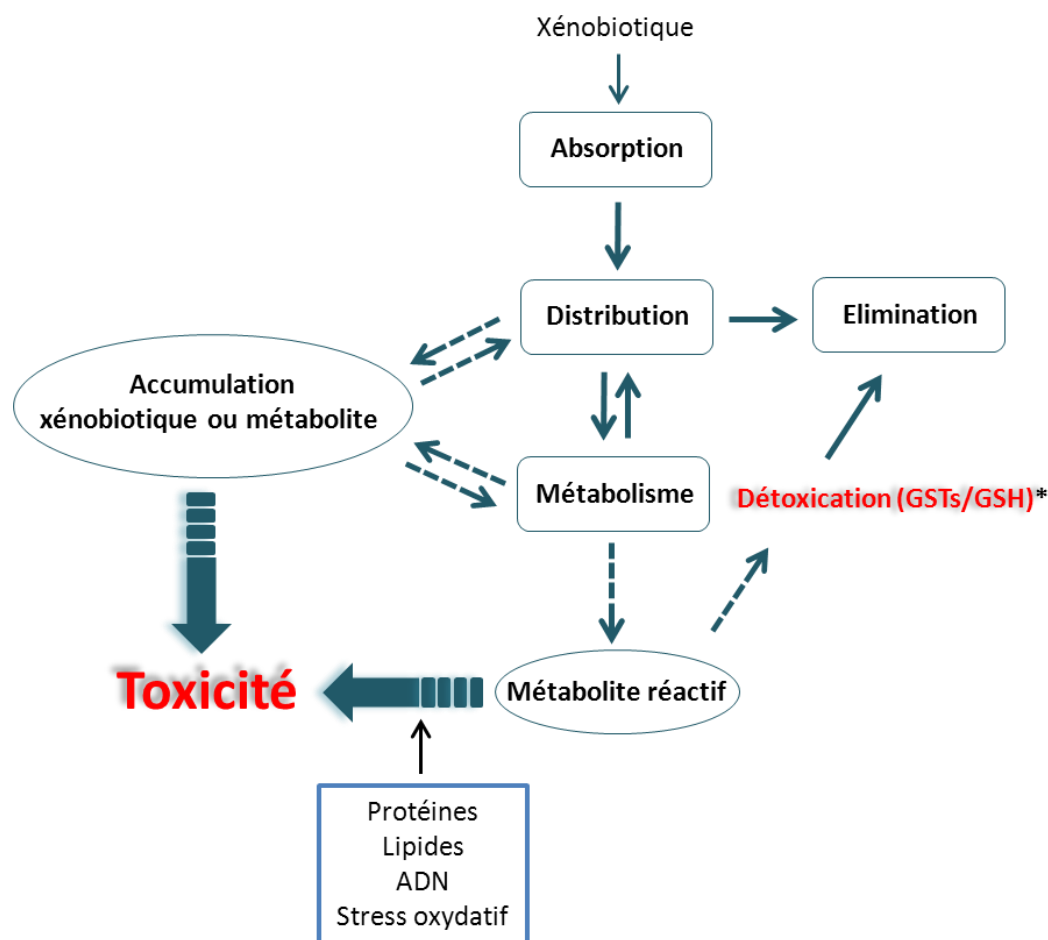


Figure (10) L'interaction d'un xénobiotique avec le corps et les principales étapes pharmacocinétiques (ADME).

* Dans certains cas (e.g. acétaminophène), la glutathion-S-transférase (GST) peut inactiver le métabolite électrophile en formant des conjugués au glutathion (GSH) (Buchard *et al.*, 2012). Dans autres cas (e.g. halogène) la GST peut être la cause de la toxicité (Guengerich, 2005b).

1.6.2 Intégration des CYPs dans le métabolisme des xénobiotiques

Le métabolisme des xénobiotiques (élimination et/ou neutralisation) se produit généralement par trois étapes reconnues ; la phase I, la phase II, et la phase III (Omiecinski *et al.*, 2011), (Figure 11).

Les réactions de phase I ou fonctionnalisation font un composé plus hydrophile, de sorte qu'il peut être efficacement éliminé par les reins ou par la voie biliaire. Ces réactions impliquent généralement l'ajout ou le démasquage d'un groupe hydroxyle, ou un autre groupe hydrophile tel qu'un groupe aminé ou sulfhydryle, par des mécanismes d'hydrolyse, d'oxydation ou de réduction. Les CYPs contribuent à approximativement 80% des réactions de phase I (Ingelman-Sundberg, 2004; Hart and Zhong, 2008).

Les réactions de Phase II (réaction de conjugaison) ont lieu généralement après la phase I mais elles peuvent intervenir seules. Ces réactions impliquent habituellement l'ajout d'un groupe polaire (sulfate ou acide glucuronique) pour augmenter la solubilité du composé, ou l'ajout d'un groupe (acétyle, méthyle, glutathion,...) pour neutraliser un groupement réactif. Les enzymes de transfert (transférases) sont responsables de la plupart des réactions de phase II, par exemple, l'uridine diphosphoglucuronyl transférase (UGT), la N-acétyl-transférase (NAT), la glutathion-S-transférase (GST), et la sulfotransférase (ST).

Enfin le métabolite obtenu (ou le produit parent inchangé) sera transporté à travers la membrane cellulaire par les protéines de transport (phase III) afin d'être éliminé.

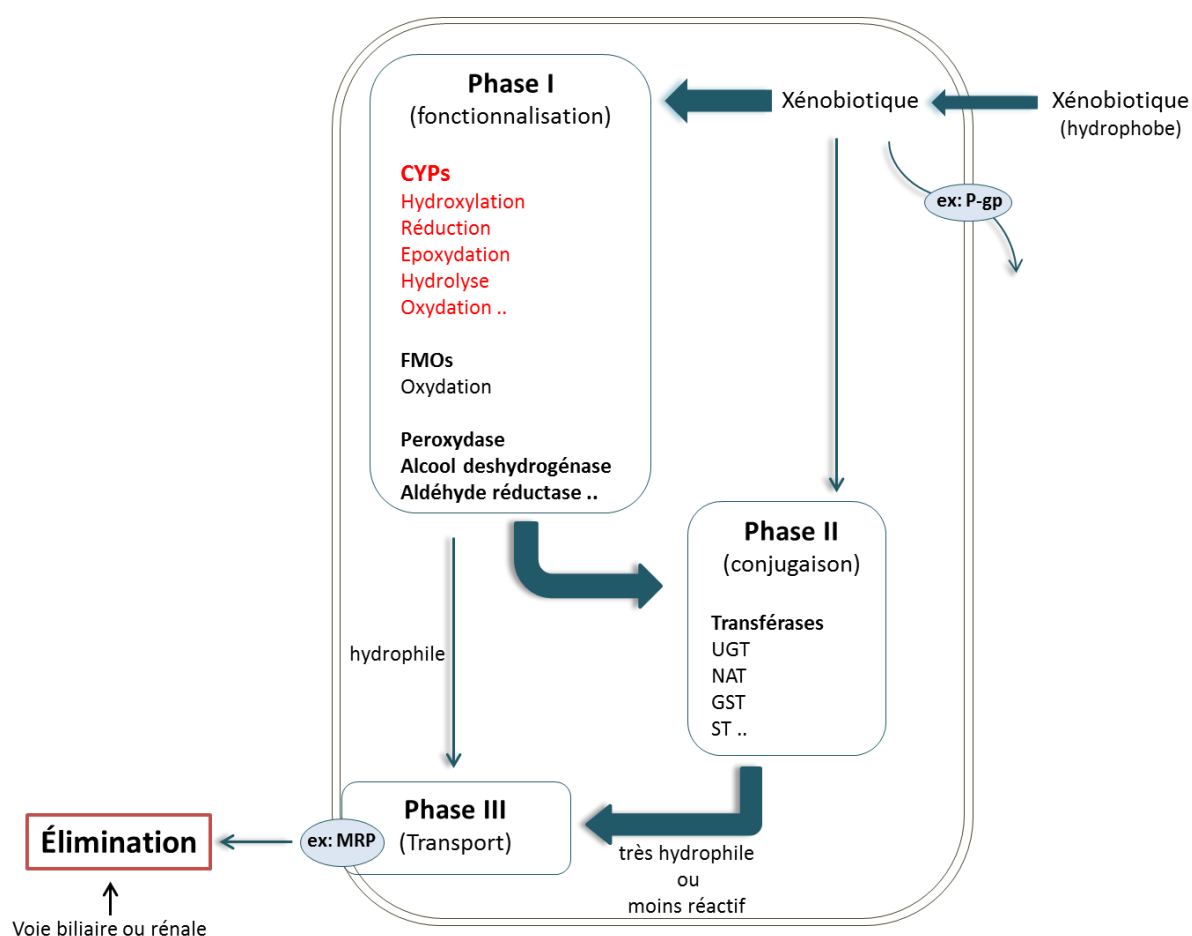


Figure (11) Enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

FMOs : flavines monooxygénases, UGT : uridine diphosphoglucuronyl transférase, NAT : la N-acétyl-transférase, GST : glutathion-S-transférase, ST : sulfotransférase. P-gp : P-glycoprotéine, MRP : (Multidrug Resistance associated-Proteins).

1.7 Variabilité d'expression des CYPs

La variabilité dans les modèles de métabolisme des médicaments a été reconnue depuis un certain temps, et antérieurement à la découverte des CYPs. Par exemple, les premiers travaux de Remmer ont montré l'influence des barbituriques sur la métabolisation des médicaments (Remmer, 1959). Contrairement aux CYPs impliqués dans la biosynthèse de composés endogènes, l'expression des CYPs qui métabolisent les xénobiotiques est très variable. L'expression et la fonction des CYPs peuvent varier en fonction de facteurs endogènes (sexe, âge, pathologies, hormones et facteurs génétiques) ou exogènes (polluants, médicaments, alimentation, addiction) (Figure 12).

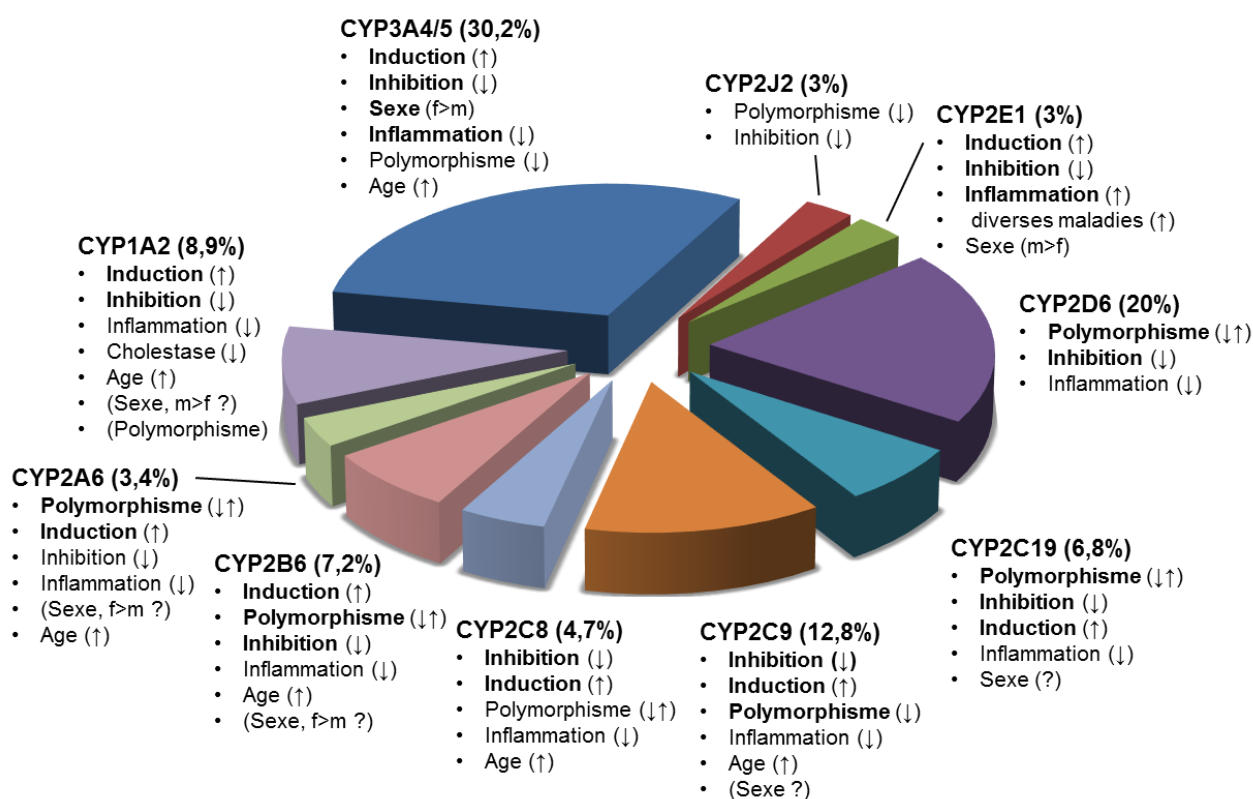


Figure (12) Proportion des médicaments utilisés en clinique et métabolisés par les CYPs (familles 1, 2 et 3) et les facteurs qui influent la variabilité de ces enzymes. D'après (Zanger and Schwab, 2013).

Les facteurs de variabilité ayant la plus grande influence sont indiqués en caractères gras. Les directions possibles d'influence sont indiquées (↑, augmentation de l'activité ; ↓, diminution de l'activité ; ↑ ↓, l'activité augmentée et diminuée). Les facteurs de signification controversés sont indiqués entre parenthèses.

1.7.1 Facteurs endogènes

1.7.1.1 Le sexe

Les variabilités basées sur le sexe en pharmacocinétique et en pharmacodynamie sont bien connues et peuvent être une source importante de différences individuelles dans la réponse aux médicaments. Certains paramètres pharmacocinétiques sont en effet influencés par le sexe en raison des différences tels que le poids, le flux sanguin du foie, la distribution des graisses l'expression d'enzymes métabolisant les médicaments et les transporteurs (Gandhi *et al.*, 2004) ainsi que l'hormone de croissance (Thangavel *et al.*, 2013). La variation d'expression des CYPs dépendant du sexe est commune chez les animaux de laboratoire tandis que chez les humains, les différences sont moins significatives. La pertinence de sexe pour le traitement médicamenteux est une question de préoccupation continue (Waxman and Holloway, 2009). La plupart des études cliniques indiquent que les femmes métabolisent les médicaments plus rapidement que les hommes particulièrement pour les substrats du CYP3A4, le principal métaboliseur des médicaments (Cotreau *et al.*, 2005). Il a aussi été rapporté que l'expression du CYP2B6 et du CYP3A5 chez les femmes est supérieure à son niveau chez l'homme (Lamba *et al.*, 2003; Thangavel *et al.*, 2013). Pour les autres CYPs, l'effet du sexe sur l'expression n'est pas clairement déterminé.

1.7.1.2 L'âge

L'influence de l'âge sur le métabolisme des médicaments est bien établie en particulier pour les personnes âgées et les nouveaux-nés, où le métabolisme des médicaments semble être considérablement inférieur à celui des tranches d'âges moyennes.

Chez les nouveaux-nés, l'immatunité de plusieurs enzymes, dont les CYPs, est la cause de la faible capacité de métabolisation. Ces enzymes établiront leurs taux normaux au cours des premières années de la vie (Hines, 2008, 2013; Saghir *et al.*, 2012). Le CYP3A7 est l'isoforme majeure à la naissance mais diminue ensuite.

La clairance (et le volume de distribution) de nombreux médicaments est diminuée chez les personnes âgées. Cette diminution est liée à la co-administration de plusieurs médicaments et à une diminution du volume du foie et de la circulation sanguine hépatique, plutôt qu'à une diminution de l'activité des enzymes hépatiques (Parkinson, 2004).

Il a été reporté une diminution d'expression de CYPs 3A et 2E1 avec l'âge tandis qu'aucune influence de l'âge a été observée sur l'expression des CYPs 1A2 et 2C (George *et al.*, 1995a). Une récente étude réalisée sur 466 foies humains a montré une augmentation de l'activité des CYPs avec l'âge notamment pour le CYP2C9. L'influence de l'âge et du sexe ont été examinées simultanément, le sexe a démontré des effets variables sur différentes tranches d'âge. Par exemple, à des âges plus jeunes (e.g. <10 ans), les femmes semblent avoir une

activité plus faible que les hommes dans la plupart des cas, tandis que chez les personnes âgées, les femmes ont tendance à avoir des activités plus élevées que les hommes (Yang *et al.*, 2010). Les effets observés sur l'activité et l'expression des CYPs durant cette étude étaient en l'occurrence de faible intensité. Globalement, l'effet de l'âge n'est pas très significatif et n'est quasiment pas pris en compte en clinique sauf en pédiatrie (Anderson and Lynn, 2009).

1.7.1.3 Les pathologies

Elles ont généralement un effet négatif sur le métabolisme des médicaments (Christensen and Hermann, 2012). Lors de l'infection, l'inflammation et le cancer, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-1 β , le TNF- α et l'IL-6, conduisent à la régulation négative sévère de nombreux enzymes métabolisant les médicaments (Slaviero *et al.*, 2003; Aitken and Morgan, 2007). C'est aussi le cas des maladies hépatiques chroniques graves pour lesquelles une diminution significative des CYPs (3A, 2C, 2E1 et 1A2) a été rapportée (George *et al.*, 1995b). Il a récemment été rapporté une diminution modérée d'expression de CYPs (2C9, 3A4) et une augmentation d'expression de CYP2E1 pour les personnes atteints de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (Naik and Zanger, 2013).

En cas de la maladie rénale chronique, une diminution de l'expression des CYPs est reportée (Yeung *et al.*, 2013).

En revanche, le diabète, quant à lui entraîne une augmentation de l'expression de CYPs (1A1, 2B, 3A, 4A, 2E1) (Kim and Novak, 2007).

1.7.1.4 Les hormones

L'hormone de croissance (GH) contrôle l'expression des CYPs (3A4, 2B6 et 3A5) qui sont aussi influencés par le sexe de l'individu (Waxman and O'Connor, 2006; Thangavel *et al.*, 2013). Une étude a reporté un effet régulateur de la GH et de triiodothyronine (T3) sur l'expression du CYP3A4 dans des cultures d'hépatocytes. L'expression du CYP3A4 a été augmentée avec la GH tandis qu'avec le T3 son expression a fortement été diminuée. Aucun effet de ces hormones n'a été observé sur l'expression de CYPs 1A2, 2C9 ou 2E1 (Liddle *et al.*, 1998).

Pendant la grossesse, la question de l'effet potentiel des hormones sur l'expression des CYPs a été soulevée. Il a notamment été constaté une augmentation de l'activité des CYPs 2D6, 3A4 et 2C9, ainsi que la diminution de l'activité du CYP1A2 (Isoherranen and Thummel, 2013).

1.7.1.5 Les facteurs génétiques (Pharmacogénétiques)

Les polymorphismes génétiques sont définis comme une variation de la séquence nucléotidique de l'ADN d'un gène à une fréquence $\geq 1\%$ dans une population normale qui peut entraîner des conséquences fonctionnelles. Il est estimé que les polymorphismes influencent

généralement 20-25% de l'efficacité des traitements médicamenteux (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007).

Selon l'enzyme concernée, deux phénotypes pharmacocinétiques peuvent être distingués chez les sujets traités par un médicament :

- ✓ « métaboliseurs lents » qui correspond aux individus porteurs de deux copies de gènes non fonctionnelles (allèle nul),
- ✓ « métaboliseurs rapides » qui désigne le phénotype "normal" où les deux copies de gènes sont fonctionnelles, représentant généralement la proportion la plus importante de la population,

Dans le cas du CYP2D6, deux phénotypes pharmacocinétiques (en plus de lent et rapide) sont aussi distingués (Figure 13).

- ✓ « métaboliseurs intermédiaires » portant un seul allèle normal ou un allèle avec une déficience de fonction,
- ✓ « métaboliseurs ultrarapides », où le phénotype provient d'un gain de fonction, soit en ayant plus de deux copies de gène fonctionnelles, soit par une mutation qui augmente l'activité de l'enzyme.

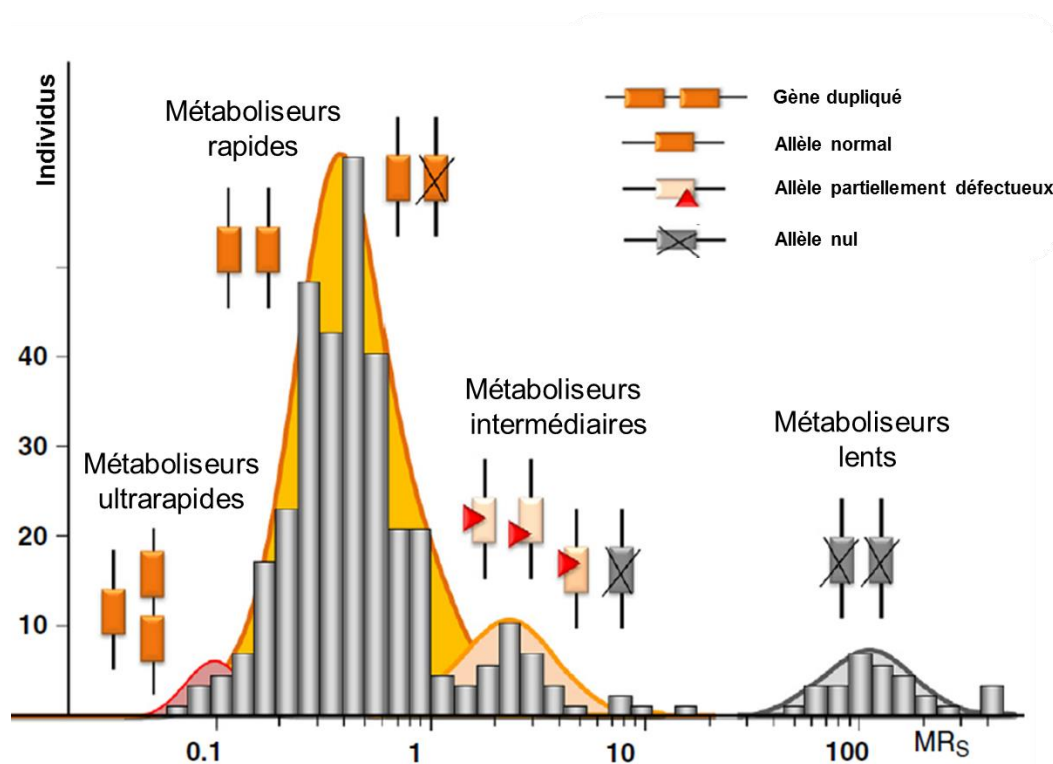


Figure (13) Les génotypes et les phénotypes de CYP2D6 métabolisant la spartéine. Adapté de (Zanger and Schwab, 2013). MR_s: ratio métabolique urinaire pour spartéine.

Les variantes qui induisent une perte de fonction mèneront à une diminution de métabolisation du médicament et à une augmentation de sa concentration plasmatique, tandis que les variantes qui entraînent un gain de fonction mèneront à une augmentation de la clairance et à une diminution de la concentration du médicament. Dans le premier cas, l'effet du médicament actif au niveau pharmacologique, est augmenté tandis que dans le second cas, l'effet de ce médicament est réduit, pouvant conduire à une toxicité liée à un surdosage. Si le métabolite d'un médicament est pharmacologiquement actif (pro-drogue), le contraire est à prévoir, et l'activité pharmacologique ou de toxicité du métabolite(s) doivent être considérés, comme par exemple dans le cas de la formation de la morphine par le CYP2D6 à partir de la codéine (Madadi *et al.*, 2013). L'efficacité d'un médicament et ses effets indésirables peuvent être liées fortement aux polymorphismes génétiques surtout si le médicament a une marge thérapeutique étroite ou si l'effet thérapeutique ou indésirable du médicament sont dose-dépendants. Le tableau (3) montre certaines variantes alléliques chez l'homme pour 6 isoformes étudiés dans ce travail.

Tableau (3) Les variantes alléliques chez l'homme pour 6 CYPs. D'après (Zanger and Schwab, 2013).

CYP allèle	Effet
CYP1A2*1C	↓ Induction chez les fumeurs
CYP1A2*1F	↑ Induction (fumeurs, omeprazole)
CYP2C9*2	↓ Activité
CYP2C9*3	↓↓ Activité
CYP2D6*3	Allèle nul
CYP2D6*4	Allèle nul
CYP2D6*5	Allèle nul
CYP2D6*6	Allèle nul
CYP2D6*10	↓ Expression et activité
CYP2D6*17	↓ Expression et activité
CYP2D6*41	↓ Expression et activité
CYP2D6*Nxn	↑ Expression et activité (↑ toxicité des opioïdes)
CYP2J2*7	↓ Expression et activité
CYP3A4*1B	Probablement, il n'y pas d'effet sur la transcription
CYP3A4*22	↓ Expression et activité
CYP3A5*3	↓ Expression et activité

Les facteurs génétiques ne sont pas négligeables. Pour la plupart des enzymes métabolisant les xénobiotiques y compris les CYPs, on peut observer des polymorphismes génétiques ayant des conséquences fonctionnelles à fréquence élevée (tels que 2D6, 2C9, 2C19) (<http://www.cypalleles.ki.se>). Les polymorphismes des enzymes métabolisant des médicaments peuvent aussi influencer les fonctions endogènes telles que la pression artérielle, les niveaux de bilirubine et le risque de suicide. Ils peuvent également modifier des facteurs exogènes comme la consommation de café et de cigarettes, l'efficacité des médicaments (Sim *et al.*, 2013), la toxicité liée aux médicaments (Johansson and Ingelman-Sundberg, 2010) ou la susceptibilité à certains cancers (Ghoshal *et al.*, 2013; Hernando-Rodriguez *et al.*, 2012).

Enfin, un nombre important de cas de variabilité interindividuelle de la réponse aux médicaments, n'est pas lié à des variations dans la séquence du gène. Les facteurs dits épigénétiques, notamment la méthylation d'ADN et les micro-ARNs (miARNs) peuvent être à l'origine de ces variations (Ingelman-Sundberg and Gomez, 2010). Récemment, de nombreux CYPs et récepteurs nucléaires se sont trouvés être régulés post-transcriptionnellement par les miARNs (Yokoi and Nakajima, 2013). De plus, les effets épigénétiques sont principalement réversibles et influencés par des facteurs endogènes (sexe, âge) et des facteurs environnementaux. La régulation épigénétique des enzymes métabolisant les médicaments, y compris les CYPs, est un domaine de recherche récent qui contribue à la compréhension globale de toxicité et de réponse aux médicaments.

1.7.2 Facteurs exogènes (xénobiotiques)

1.7.2.1 Induction et l'inhibition

Les substances exogènes qui produisent l'**induction** ou l'**inhibition** des CYPs jouent un rôle principal dans la variabilité d'expression et de fonction de ces enzymes. Les inducteurs des CYPs qui métabolisent les xénobiotiques sont généralement peu sélectifs. Les inhibiteurs des CYPs peuvent être sélectifs pour une isoforme ou non sélectifs. Dans le cas d'induction ou d'inhibition non sélective, cela peut influencer l'expression de plusieurs isoformes. L'effet inhibiteur est généralement rapide (voire immédiat) tandis que l'effet d'inducteur est lent (jours voire semaines) (Hollenberg, 2002).

Comme la concentration d'une protéine est déterminée par l'équilibre entre sa synthèse et sa dégradation, l'**induction** d'un CYP peut résulter soit de la stimulation de sa synthèse (le plus souvent par augmentation de sa transcription) soit de la diminution de sa dégradation. Dans

le deuxième cas, la concentration de CYPs peut augmenter plus rapidement par rapport à l'activation transcriptionnelle (Hollenberg, 2002). L'activation transcriptionnelle des CYPs (comme aussi pour les enzymes de phase II et III de métabolisation) est régulée par des membres de la famille des récepteurs nucléaires (Figure 14), qui sont activés par une variété de composés endogènes et exogènes (Tableau 4).

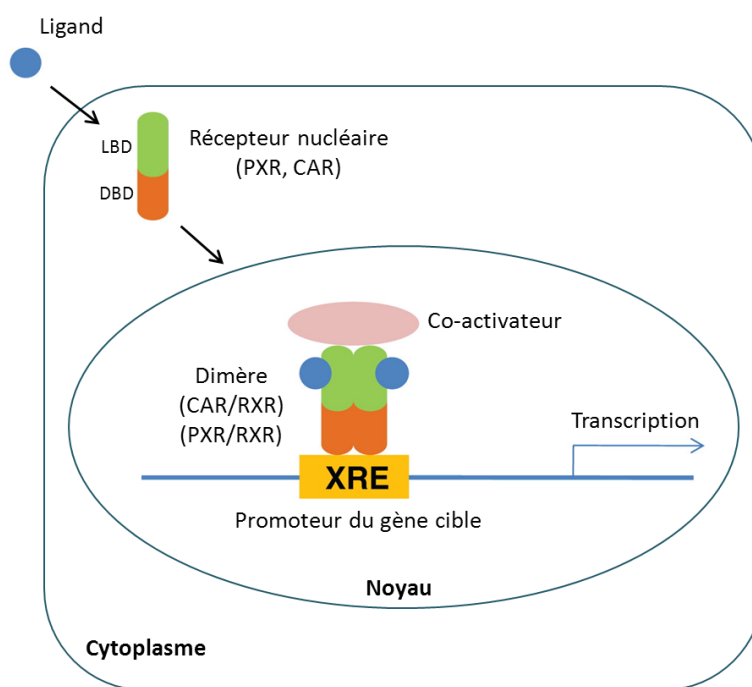


Figure (14) Schéma général de l'induction des CYPs, d'après (Chai *et al.*, 2013).

e.g. les récepteurs nucléaires (PXR et CAR) : le ligand (xénobiotique ou endobiotique) active le récepteur nucléaire qui va émigrer vers le noyau où il forme un hétérodimère avec RXR (retinoid X receptor). Ce dimère se fixe à l'ADN et recrute des co-activateurs. Cela permet la transcription du gène cible. PXR : pregnane X receptor, LBD : domaine de liaison au ligand, DBD : domaine de liaison à l'ADN. XRE : élément de réponse aux xénobiotiques.

Certains récepteurs nucléaires fonctionnent avec ou sans RXR, d'autres peuvent fonctionner comme monomère ou homodimère (Wallace and Redinbo, 2013).

Tableau (4) Les récepteurs associés à l'expression et la régulation des CYPs métabolisant les xénobiotiques. D'après (Lewis, 2004).

CYP	Récepteur	Inducteur typique
1A et B	AhR	TCDD, HAPs
2A	HNF4α ^a	Phénobarbital
2B	CAR	Phénobarbital
2C	RAR	Acide rétinoïque
2D	HNF4α ^a	Aucun connu ^b
2E	Aucun connu ^c	Ethanol
3A	PXR, GR	Rifampicine

^a NHF-4 est un facteur de transcription ^b Aucune induction significative est trouvée par les inducteurs classiques des CYPs. ^c Régulé par des modifications post-traductionnelles. AhR : Aryl hydrocarbon receptor, CAR : Constitutive androstane receptor, GR : Glucocorticoid receptor, HNF4α : Hepatocyte nuclear factor 4α, PXR : Pregnane X receptor, RAR : Retinoic acid receptor, TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques

Le tableau (5) montre les principaux inducteurs des CYPs humains classés en 4 catégories en fonction du récepteur activé ou de leur classe chimique.

Tableau (5) Principaux inducteurs des CYPs humains. D'après (Guengerich, 2005a).

Classe d'inducteur	Origine	Exemple	CYPs induits
Ligands des AhR	Tabac, Viande grillée Expositions accidentelles	Polychlorobiphényle	CYPs 1A1, 1A2
Barbituriques	Médicaments, DDT	Diphénylhydantoïne	CYPs 2C, 3A4
Ligands des PXR	Certains stéroïdes et antibiotiques et autres médicaments	Rifampicine, PCN	CYP3A4
Inducteurs du CYP2E1	Ethanol, isoniazide	Ethanol	CYP2E1

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane, PCN : Prénénolone carbonitrile

L'inhibition correspond au blocage de l'activité enzymatique des CYPs et elle peut être réversible ou irréversible (Murray and Reidy, 1990). L'inhibition réversible se produit quand l'inhibiteur atteint des concentrations suffisantes à proximité du CYP pour se fixer d'une

manière non covalente sur le site actif et diminuer la vitesse de l'enzyme. Les inhibiteurs compétitifs des CYPs sont les plus communs et leur effet est transitoire. En revanche, l'inhibition irréversible se produit lorsque l'agent inhibiteur est converti en un métabolite réactif qui se lie de manière covalente à l'hème ou à l'apoprotéine. La suppression de cette espèce n'est pas possible et la perte de l'activité de l'enzyme est permanente (jusqu'à la resynthèse de la protéine). Le tableau (6) présente des inhibiteurs sélectifs des CYPs qui métabolisent les médicaments.

Tableau (6) Quelques inhibiteurs sélectifs des CYPs qui métabolisent les médicaments. D'après (Zanger and Schwab, 2013).

CYP	Inhibiteur sélectif
CYP1A2	Furafylline
CYP2A6	8-methoxypsoralène, Tranylcypromine
CYP2B6	2-phenyl-2-(1-piperdiny) propane, thioTEPA
CYP2C8	Montelukast
CYP2C9	Sulphaphénazole, acide tiénilique
CYP2C19	(-)-N-3-benzyl-phenobarbital
CYP2D6	Quinidine
CYP2E1	Diethyldithiocarbamate, Disulfiram, 4-methylpyrazole
CYP2J2	Danazole
CYP3A4/5	Azamulin, Ketoconazole

1.7.2.2 Les produits concernés

Les facteurs exogènes (environnementaux) qui influencent l'expression et la fonction des CYPs ont une origine diverse :

1.7.2.2.1 Polluants

Les polluants environnementaux comme les pesticides influencent aussi l'expression des CYPs. Le DDT est un inducteur des CYPs 2C et 3A4. Le TCDD quant à lui est un inducteur de la famille 1 et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) également.

1.7.2.2.2 Médicaments

Les médicaments sont des principaux inducteurs et inhibiteurs des CYPs (Tableaux 2, 3 et 4).

1.7.2.2.3 Alimentation

Certains produits alimentaires contiennent des composés qui peuvent jouer le rôle d'inducteur ou inhibiteur d'un CYP. Le CYP1A2 est induit par le café, les légumes crucifères et la viande grillée qui est riche en HAPs. Le CYP3A4 quant à lui est inhibé par jus de pamplemousse

(essentiellement par des furanocoumarines et un flavonoïde ; la naringine) (Hanley *et al.*, 2011).

1.7.2.2.4 Produits Addictifs

L'alcool est un inducteur du CYP2E1. La fumée de cigarette est riche en HAPs qui sont des inducteurs des CYPs 1A1 et 1A2. Chez les fumeurs, les substances responsables de la diminution de l'activité du CYP2A6 et l'augmentation de l'activité du CYP2E1 restent encore inconnues (Hukkanen *et al.*, 2010). L'expression des CYPs 2B6, 2D6 et 2E1 dans le cerveau est plus élevée chez les fumeurs (Miksys and Tyndale, 2006).

1.8 Conséquences du métabolisme des xénobiotiques par les CYPs

Les CYPs sont des enzymes ubiquistes mais les CYPs hépatiques ont le rôle principal dans l'oxydation des xénobiotiques. Le foie est la principale voie de détoxification de tous les produits chimiques exogènes dans l'organisme. Un tiers du débit sanguin total du corps est pompé à travers le foie. Le foie filtre le sang et élimine les substances nocives telles que les médicaments, les bactéries et les toxines.

1.8.1 Elimination

L'étape de fonctionnalisation des xénobiotiques par les CYPs sert à rendre ces composés hydrophobes plus hydrophiles pour être éliminés directement ou pour faciliter les réactions de conjugaison catalysées par les enzymes de phase II. Après avoir été transporté hors de la cellule par des pompes d'efflux (phase III), le métabolite peut être éliminé dans la bile ou dans l'urine, ou bien re-métabolisé dans d'autres tissus.

1.8.2 Activation

Dans certain cas et pour certaines substances, l'étape de fonctionnalisation par les CYPs peut donner naissance à un métabolite réactif. C'est le cas des pro-cancérogènes qui sont métabolisés par certains CYPs (e.g. 1A1, 1B1, 1A2) en cancérogènes.

1.8.3 Interactions médicamenteuses

Les médicaments peuvent être classés comme des inducteurs, des inhibiteurs, ou des substrats simples d'un CYP. Les substrats des CYPs ont une spécificité relative et chevauchante. Un médicament peut être métabolisé par plusieurs isoformes et un isoforme peut métaboliser plusieurs médicaments. Environ 75% de médicaments sont métabolisés par les CYPs (Guengerich, 2008). Parmi tous les CYPs, 6 isoformes (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 et 3A4/5) catalysent 90% de ces réactions (Guengerich, 1997). Le fait qu'un grand nombre de médicaments soient métabolisés par un petit nombre d'isoformes est une importante cause des interactions médicamenteuses. La capacité d'un médicament substrat du CYP d'affecter la concentration d'un autre est connue sous le terme d'interaction médicamenteuse. Deux

types d'interactions médicamenteuses principales, au niveau des CYPs, sont distingués : l'induction et l'inhibition de l'activité enzymatique (Guéguen *et al.*, 2006; Cascorbi, 2012). Lorsqu'un médicament est inducteur d'un CYP, la prise simultanée d'un autre médicament métabolisé par cet isoforme induit, va augmenter son métabolisme. Cela va accélérer sa clairance et diminuer son efficacité thérapeutique. Si le médicament est une pro-drogue, le fait d'augmenter sa production va augmenter l'effet thérapeutique ou indésirable. Au contraire, si un médicament inhibe l'activité d'un CYP, la concentration du deuxième médicament va augmenter en induisant une inefficacité thérapeutique (cas d'une pro-drogue) ou une surdose (cas d'un médicament actif). L'inhibition réversible est généralement la cause la plus commune des interactions médicamenteuses (Hollenberg, 2002). Un grand nombre de facteurs peuvent affecter le métabolisme des médicaments par les CYPs, rendant les interactions médicamenteuses très difficile à prédire. Ces facteurs influencent également de manière significative le développement des réactions indésirables aux médicaments.

1.9 Le rôle des CYPs en toxicologie

Malgré le rôle essentiel des enzymes de phase I et II dans la détoxification des xénobiotiques, ils peuvent être, dans certains cas, à l'origine d'effets toxiques (Guengerich, 2008; Park *et al.*, 2011).

a) La bioactivation de certains composés, par les CYPs conduit à la formation de métabolites chimiquement réactifs (radicaux libres, intermédiaires électrophiles tels que les époxydes, les quinones, les aldéhydes α et β insaturés...) (Guengerich, 2008). Ces espèces réactives et instables réagissent spontanément de manière irréversible avec les constituants cellulaires, des nucléophiles comme les protéines, les acides nucléiques et/ou les lipides insaturés. Ce phénomène conduit à un dysfonctionnement des protéines, à la peroxydation lipidique, à des lésions de l'ADN, au stress oxydatif etc... et par conséquent aux effets cytotoxiques, génotoxiques ou immunotoxiques (Park *et al.*, 2011, Zangar *et al.*, 2004).

En plus de leur rôle dans la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), les métabolites réactifs produits par les CYPs peuvent contribuer au stress oxydatif par l'épuisement du glutathion, un important antioxydant cellulaire. Ils participent également, au cycle redox (Guengerich, 2006) et aux lésions de l'ADN mitochondriale (Gonzalez, 2005; Pessayre *et al.*, 2012).

Dans certains cas, l'intermédiaire réactif qui vient d'être formé à l'intérieur du site actif hydrophobe du CYP peut se fixer directement sur le CYP lui-même et le détruire. Cette inactivation «suicidaire» fait partie des mécanismes de protection immédiats, en empêchant la formation de nouveau de l'intermédiaire réactif par le CYP. D'un autre côté, ce phénomène rend le CYP inactif, influençant la métabolisation d'autres médicaments et pouvant produire

des effets indésirables ou toxiques. Enfin, la liaison covalente entre le métabolite réactif et la protéine peut induire des effets immunotoxiques dans lesquels sont observées l'apparition d'anticorps contre la protéine modifiée et celle d'autoanticorps contre la protéine non modifiée. Cette succession de réactions est susceptible d'induire des hépatites comme le cas d'hépatites induites par l'acide tiénilique ou la dihydralazine (Beaune *et al.*, 1994).

b) La perturbation endocrinienne peut aussi avoir lieu suite à la production d'un métabolite ayant une activité ou une affinité plus importante que le composé initial pour un récepteur nucléaire ou une protéine de transport (Kitamura *et al.*, 2008). Des substances pro-œstrogènes comme des pesticides (e.g. biphényle, DDT), des polluants (B(a)P, 2-nitrofluorène) sont bioactivées par des CYPs pour avoir une activité œstrogénique.

c) 66% de pro-cancérogènes sont activés par les CYPs dont les membres de la famille I (1A1, 1A2 et 1B1) et les CYPs 2A6, 2E1 et 3A4 sont les principaux activateurs (Rendic and Guengerich, 2012) (Figure 15), (Tableau 7).

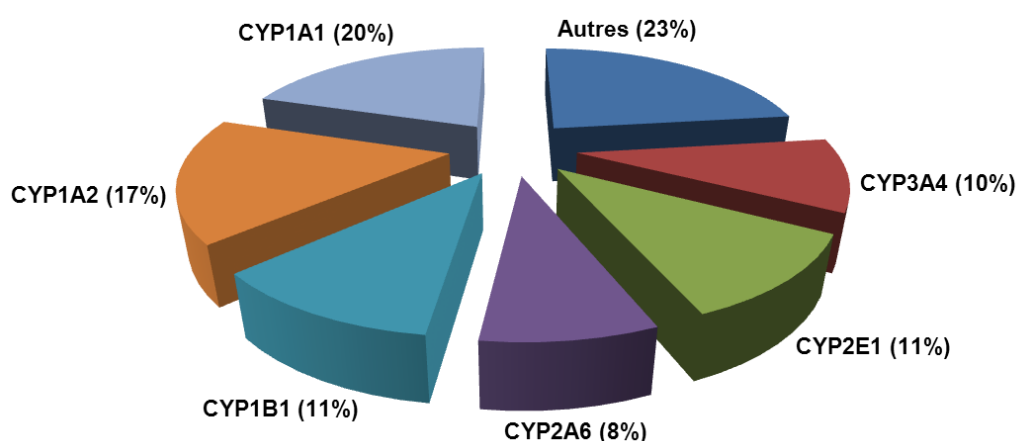


Figure (15) Les principaux CYPs activateurs de cancérogènes. D'après (Rendic and Guengerich, 2012).

Tableau (7) Exemples de procarcinogènes activé par les CYPs.

CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP2A6	CYP2E1	CYP3A4
HAPs	PhIP	HAPs	NNN	Benzène	Aflatoxine B ₁
PhIP	IQ	PhIP	DMN	Chloroforme	Aflatoxine G ₁

PhIP : 2-Amino-1-méthyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*] pyridine, IQ : 2-Amino-3-méthylimidazo-[4,5-*f*] quinoline, NNN : Nornitrosonicotine, DMN : N, N-Diméthylnitrosamine

d) Les interactions médicamenteuses sont ainsi une source importante d'intoxications cliniques. Il a été estimé que les interactions médicamenteuses pouvaient justifier 5% des hospitalisations par an (Becker *et al.*, 2007). Les facteurs qui affectent la fonction et l'expression des CYPs (les variantes génétiques, l'induction et l'inhibition) ont un impact majeur sur les résultats du traitement (Murray, 2006).

En fin, les facteurs (génétiques, inhibition) qui diminuent l'expression ou l'activité d'un CYP particulier qui participe à la détoxification, rendent le sujet plus susceptible à ces effets. En revanche, les facteurs ayant un effet inverse sur ce CYP offrent une protection contre la toxicité.

Les connaissances sur les CYPs humains ont eu des répercussions importantes dans la compréhension du métabolisme des médicaments et des xénobiotiques en général. Les changements dans l'expression des CYPs modifient le métabolisme des xénobiotiques et des substrats endogènes, entraînant un déséquilibre dans l'homéostasie de l'organisme.

Avoir des données quantitatives sur les niveaux d'expression de ces enzymes dans différents organes (e.g. le foie et l'intestin grêle), chez l'homme, dans des modèles animaux, et *in vitro*, peut contribuer à améliorer la compréhension et la prédiction du profil pharmacocinétique et toxique des nouveaux médicaments et d'autres produits chimiques.

2. Quantification de protéines en biologie

Les protéines représentent plus de la moitié de la masse sèche d'une cellule (55%) et jouent un rôle prédominant dans la plupart des processus biologiques. Le terme "protéomique" est apparu en 1995 et définit l'étude qualitative et quantitative de l'ensemble des protéines en tenant compte de leurs éventuelles modifications de qualité ou de quantité dans une lignée cellulaire, un tissu ou un organisme (Wilkins *et al.*, 1995) (Figure 1).

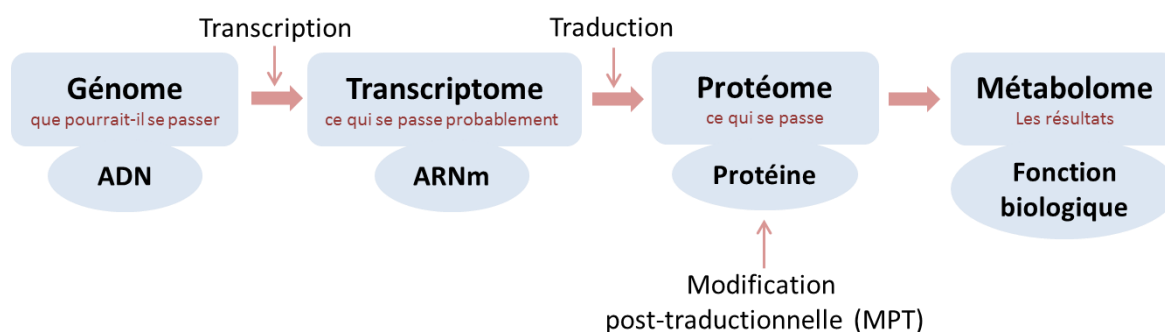


Figure (1) : Schéma décrivant le rôle joué par les protéines dans les processus biologiques.

La protéomique s'est affirmée comme une science à part entière grâce aux progrès réalisés dans le séquençage de l'ARN et de l'ADN. L'analyse qualitative et quantitative de protéines donne des informations complémentaires qui aident à comprendre la variation au niveau de l'expression des gènes *in vivo* (Anderson and Anderson, 1998).

La quantification des protéines est un indicateur important autant pour la biologie moléculaire que pour la recherche clinique puisque certaines protéines sont considérées comme des biomarqueurs de maladie ou des indicateurs de l'efficacité de traitements.

Il est important de noter cependant que les diverses méthodes de quantification développées pour la protéomique constituent un défi véritablement multidisciplinaire où la chimie, la biologie, la physique, l'informatique se rencontrent.

2.1 Dosage de protéines par Spectroscopie d'absorption ultraviolet

Les acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) dans les protéines absorbent la lumière à 280 nm tandis que les liaisons peptidiques absorbent la lumière à 205 nm. La quantité de protéine dans l'échantillon est déterminée en utilisant la loi de Beer- Lambert.

Pour cette méthode non destructive et qui n'a pas besoin d'incubation de l'échantillon avec un chromophore exogène, la pureté de la protéine en solution ou l'absence de produits qui absorbent l'UV à la longueur d'onde d'intérêt dans l'échantillon (e.g. acide nucléiques) est un facteur clé dans la fidélité du résultat (Simonian and Smith, 2006).

2.2 Dosage colorimétrique

Ce genre de test est fondé sur l'utilisation de composés chimiques, qui en présence de protéines vont former un complexe qui va colorer le mélange. Il est alors possible de mesurer l'intensité de la coloration, qui est proportionnelle à la concentration en protéines totales.

Pour la quantification des protéines en solution par ce type de dosage, on peut citer la méthode du biuret (Rose, 1833), la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), Bleu de Coomassie ou méthode de Bradford (Bradford, 1976) et la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA) (Smith *et al.*, 1985) (Tableau 1).

Tableau (1) Les principales méthodes de dosage colorimétrique utilisées pour doser les protéines totales dans un échantillon.

Méthode	Réactif	Absorption	Range ^a	Remarques
Biuret	Cu ²⁺ /milieu alcalin	540 nm	5-160 mg/ml	Faible sensibilité, méthode de choix pour grande concentration
Lowry	Cu ²⁺ / Folin-Ciocalteu/ milieu alcalin	750 nm	1-1500 µg/ml	Sensible aux detergents
BCA	Cu ²⁺ / BCA/ milieu alcalin	562 nm	20-2000 µg/ml	Sensible aux phospholipides, ammonium sulfate
Bradford	Bleu de Coomassie G250/ milieu acide	595 nm	100-2000 µg/ml	Sensible aux detergents

^a d'après (Krohn, 2002).

La méthode à l'acide bicinchoninique (BCA) a été utilisée dans ce travail afin de quantifier la concentration de protéines totales dans tous les échantillons biologiques :

Le réactif est constitué d'acide bicinchoninique et d'ions cuivriques Cu²⁺ en milieu alcalin. Les protéines réduisent les ions Cu²⁺ en Cu¹⁺ qui forment avec deux molécules d'acide bicinchoninique à 37°C un complexe stable coloré (λ_{max} = 562 nm). En faisant une gamme

de BSA (sérum albumine bovine), on peut alors déduire la concentration en protéines totales. Cette méthode est plus sensible et moins influencée par les interférents que la méthode du biuret (Smith *et al.*, 1985).

2.3 Gel électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) ou (2D)

La première étude en protéomique réalisée à l'aide de la technique de gel d'électrophorèse bidimensionnelle 2D est décrite par O'Farrell en 1975 (O'Farrell, 1975). Les protéines sont séparées selon le point isoélectrique dans la première dimension, et en fonction du poids moléculaire par électrophorèse sur dodécyl sulfate de sodium (SDS) dans la seconde dimension. En fonction de ces deux paramètres indépendants, il est possible d'obtenir une distribution pratiquement uniforme de points (ou taches ou « spots ») de protéine à travers un espace 2D (Figure 2). Les protéines sont habituellement détectées par coloration à l'argent ou au bleu de Coomassie, ou par l'analyse en spectrométrie de masse. Cette technique permet d'analyser et de détecter des protéines à partir d'échantillons biologiques complexes grâce à sa résolution et sa sensibilité, elle offre une carte de protéines intactes, ce qui reflète les changements dans le niveau d'expression des protéines, des isoformes ou modifications post-traductionnelles. Cette technique a été utilisée comme technique de séparation des protéines afin d'effectuer une analyse structurale, qualitative ou quantitative par spectrométrie de masse (Rabilloud, 2002). En fonction de la taille du gel et du gradient de pH utilisé, l'électrophorèse 2D peut résoudre plus de 5000 protéines simultanément (2000 protéines couramment) et détecter et quantifier moins de 1 ng de protéine par spot (Görg *et al.*, 2004). Cette technique a cependant des points faibles : sa reproductibilité n'est pas facile à assurer (utilisateur/préparation des échantillons dépendante), les protéines à faible concentration sont difficile à détecter (Gygi *et al.*, 1999). De plus, cette méthode laborieuse et difficile à automatiser, prend du temps : un seul échantillon analysé par gel qui a besoin de 2 jours de préparation en générale.

Certains types de protéines sont difficiles à analyser par les gels 2D telles que les très grandes ou très petites, très acides ou basiques, et les protéines très hydrophobes (Görg *et al.*, 2004). De plus le gel 2D a une faible performance pour la séparation des protéines membranaire y compris les CYPs (Galeva and Altermann, 2002).

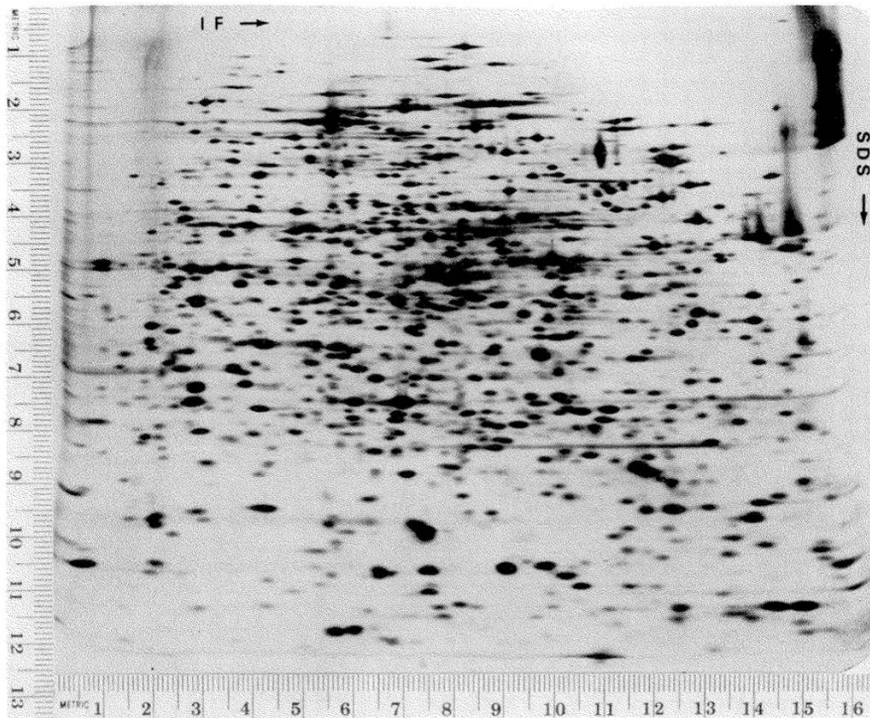


Figure (2) Séparation de protéines d'*Escherichia coli*.

Chaque spot correspond à une protéine séparée selon son point isoélectrique dans la première dimension, et de son poids moléculaire par SDS-PAGE dans la seconde dimension (O'Farrell, 1975).

Le gel d'électrophorèse bidimensionnelle différentielle (2D-DIGE) est une amélioration effectuée sur la technique 2D pour la rendre plus adaptée à la quantification de protéines en termes de sensibilité, reproductibilité et de temps d'analyse. 2D-DIGE permet d'analyser plusieurs extraits de protéines marqués chacun par une sonde à fluorescence différente et ensuite séparés sur le même gel 2D (Marouga *et al.*, 2005). Pourtant, cette amélioration augmente la complexité des gels et les différents types marqués d'une protéine ne co-migrent pas entre eux.

Le gel à une dimension 1D-SDS-PAGE qui permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire, est utilisé dans la quantification des protéines comme étape d'enrichissement ou séparation des protéines afin d'être quantifiées ensuite par western blot (WB) ou par spectrométrie de masse.

2.4 Méthodes immunologiques

Ce sont des techniques fondées sur le principe de reconnaissance antigène-anticorps (Figure 3).

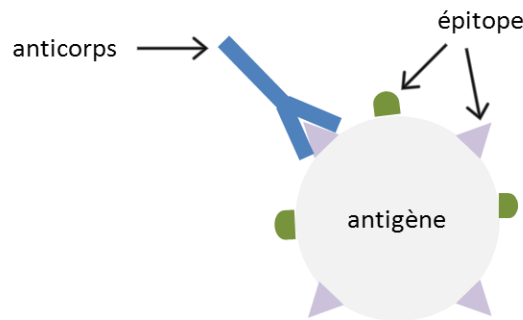


Figure (3) présentation de la reconnaissance antigène-anticorps.

Un anticorps est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser un agent étranger (antigène) de manière spécifique. Les anticorps utilisés dans les tests immunologiques sont obtenus en injectant, chez un animal (lapin, cheval, chèvre, cochon, souris), un antigène donné, puis en recueillant les anticorps présents dans son sang. L'antigène contient des sites de reconnaissance moléculaire appelés épitopes. L'anticorps est appelé monoclonal quand il reconnaît un seul épitope et appelé polyclonal quand il reconnaît différents épitopes sur l'antigène. Le sérum obtenu à partir d'animaux immunisés contre un antigène contient un mélange d'anticorps reconnaissant plusieurs épitopes du même antigène mais avec des spécificités et des affinités différentes selon les épitopes.

2.4.1 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

L'ELISA est une technique immuno-enzymatique fondée et développée par Peter Perlmann et Eva Engvall de l'Université de Stockholm dans les années 70s (Lequin, 2005). Elle est aujourd'hui utilisée communément dans les laboratoires cliniques ou de recherche pour le dosage en routine, qualitatif ou quantitatif, de protéines variées (allergènes alimentaires, test HIV, cytokines, etc ...) (Lequin, 2005).

Cette méthode est fondée sur la détection d'une réaction antigène-anticorps dans laquelle l'anticorps est lié à un enzyme et va, en présence d'un substrat donné, former une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéine d'intérêt (anticorps ou antigène) dans l'échantillon. La quantification d'un composé par cette technique est possible en faisant une gamme en parallèle en utilisant des concentrations connues du composé cible (anticorps ou antigène). Il y a plusieurs types de test ELISA ; les plus utilisés sont :

Test ELISA indirect : Ce test est utilisé en clinique afin de détecter ou doser des anticorps, comme dans le cadre du test HIV (Respass *et al.*, 2001) (Figure 4.A)

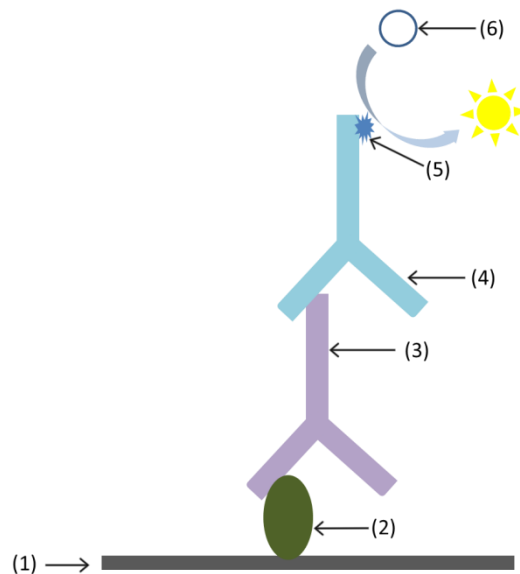


Figure (4.A) Test ELISA : indirect (dosage un anticorps) ou direct (dosage un antigène).

Dans ce test et dans le cas du dosage d'un anticorps (test HIV), l'antigène (2) est fixé sur un support (1) (plaque de 96 puits). L'anticorps à doser (3) dans le sérum du patient se fixe en suite sur l'antigène spécifique (2). Dans une troisième étape, l'anticorps de détection (4) se fixe spécifiquement sur l'anticorps à doser (3). Finalement, l'anticorps de détection (4) est lié avec une enzyme (5) (horseradish peroxydase (HRP), alcaline phosphatase ou beta-galactosidase), qui en présence de son substrat le transforme en produit coloré.

Test ELISA direct : Ce test permet la détection ou la quantification d'un antigène (2) présenté dans un échantillon. Cette technique a été utilisée récemment par (De Bock *et al.* 2012 afin de quantifier le CYP3A4 (antigène) dans des microsomes de foie d'enfants ayant subi une transplantation de foie. Un anticorps polyclonal qui connaît la protéine 3A4 humaine entière est utilisé comme anticorps premier (3), l'enzyme (5) de horseradish peroxydase (HRP) conjugué à un anticorps secondaire (4) (anti-IgG, un anticorps de chèvre anti-humain) a été utilisé pour la détection (Figure 4.A).

Test ELISA en sandwich : Ce test permet le dosage d'un antigène qui se trouve entre 2 anticorps spécifiques, reconnaissant des épitopes différents de cet antigène, ce qui augmente la spécificité et la sensibilité de détection de cet antigène (Figure 4.B).

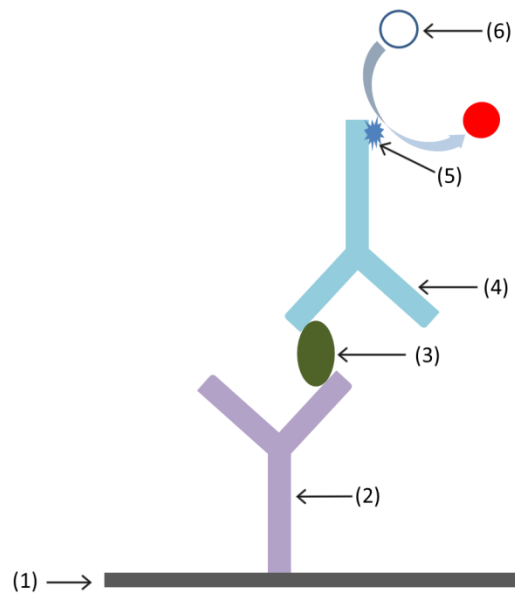


Figure (4.B) Test ELISA en sandwich.

Dans ce test, l'anticorps de capture (2) est fixé sur un support (1) (plaque de 96 puits). L'antigène à identifier (3) dans l'échantillon se fixe ensuite sur l'anticorps de capture (2). Dans une troisième étape, on fixe l'anticorps de détection (4) marqué avec une enzyme (5) sur l'antigène (3). Une solution révélatrice, contenant le substrat (6) de l'enzyme, est finalement ajoutée et l'intensité de la coloration issue de la réaction enzyme/substrat est mesurée par un photomètre.

L'ELISA en sandwich est utilisée dans le test de grossesse « à la maison », l'antigène détecté est l'hormone chorio-gonadotrophique humaine (hCG) dans l'urine (Gupta *et al.*, 1985), et a été considérée comme la méthode de choix pour doser les médiateurs d'inflammation (cytokines) et utilisé communément dans les laboratoires cliniques et de recherche biomédicale (Leng *et al.*, 2008).

Plusieurs modifications ont été faites pour rendre cette technique plus rentable ou plus sensible ; des tests multiplex ont été développés pour doser plusieurs composés dans un seul test et cela permet d'économiser l'échantillon et le temps d'analyse. Des essais multiplex ont été validés par Prabhakar *et al.* pour doser les cytokines Th1/Th2 dans le sérum humain et dans un surnageant de cultures de cellules mononucléaires de sang périphérique humain (human peripheral blood mononuclear cell, PBMC) (Prabhakar *et al.*, 2004).

L'anticorps secondaire a été marqué par un isotope stable à la place d'un enzyme afin d'être détecté par spectrométrie de masse pour augmenter la sensibilité de la technique (Careri *et al.*, 2007).

Test ELISA de compétition : Dans ce test (Figure 4.C), une concentration connue du même antigène cible à doser est fixée dans les puits (1). Ensuite, des échantillons avec des concentrations inconnues d'antigène cible (2) sont ajoutés dans les puits. Une quantité connue d'un anticorps de détection (3), marqué, dirigé contre l'antigène cible est ensuite ajouté aux puits. Les complexes antigène-anticorps solubles sont alors éliminés par lavage, et les quantités d'anticorps liés à l'antigène fixé sur la plaque sont déterminées. Le signal obtenu dans l'ELISA de compétition est opposé à celui d'autres tests ELISA. Plus le signal est faible, plus la concentration de l'antigène est élevée dans l'échantillon puisque l'antigène libre interdit à l'anticorps de se lier à l'antigène fixé sur la plaque.

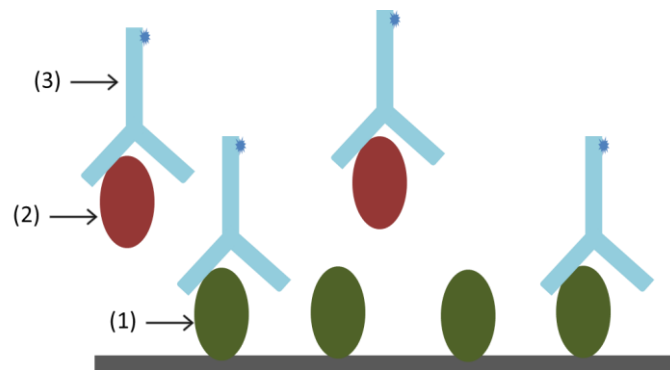


Figure (4.C) Test ELISA de compétition.

La méthode ELISA est une méthode rapide à grande capacité, comparé au WB, car plusieurs protéines et un grand nombre d'échantillons peuvent être dosés en même temps. Par contre, elle est limitée par la spécificité de l'anticorps et la qualité des standards.

2.4.2 Western Blot (WB)

Cette technique a été décrite pour la première fois par Towbin *et al.* (Towbin *et al.*, 1979), et depuis, elle est utilisée communément pour identifier, quantifier et déterminer la taille des protéines. Towbin *et al.* ont combiné la séparation de protéines par électrophorèse sur gel et la technique immunologique. Après avoir été séparées sur un gel polyacrylamide, les protéines sont transférées vers une membrane de nitrocellulose (ou de nylon). Ensuite, la protéine d'intérêt est liée à un anticorps spécifique. Le complexe protéine-anticorps est alors détecté en utilisant un anticorps secondaire, couplé à une sonde à fluorescence (détection par fluorescence) ou à un enzyme qui va catalyser une réaction en présence d'un substrat particulier qui sera coloré ou émettra de la lumière (détection par chimioluminescence) (Figure 5).

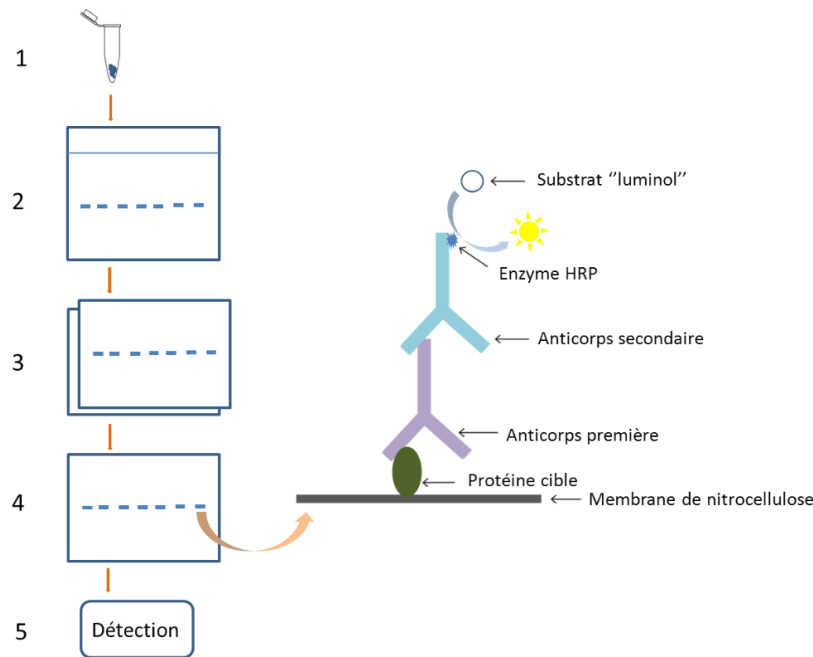


Figure (5) Protocole de western blot.

1. Préparation des échantillons (lysats cellulaires, extrait de tissus, protéine purifiée).
2. Électrophorèse sur gel : les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE selon leur taille (dans la figure, seule la protéine cible est présentée sur le gel, étapes 2 et 3).
3. Transfert : Les protéines séparées sur le gel sont transférées et fixées sur une membrane de nitrocellulose.
4. Application des anticorps : la surface de la membrane qui ne contient pas les protéines d'intérêt est bloquée par des protéines (Albumine de sérum bovin BSA ou lait sans gras 5%) afin d'éviter les liaisons non spécifiques entre l'anticorps et la membrane. Après le blocage, la membrane est incubée avec l'anticorps premier qui lie spécifiquement la protéine d'intérêt. Dans l'étape suivante, l'anticorps secondaire est appliqué pour deux buts ; la détection du complexe protéine d'intérêt- anticorps premier, et l'amplification du signal pour augmenter la sensibilité. En fait, l'anticorps secondaire est conjugué avec un enzyme (HRP) en cas de détection par chimioluminescence, qui en présence de son substrat (luminol) donne une lumière. En cas de détection par fluorescence, l'anticorps secondaire est couplé à une sonde à fluorescence.
5. Détection : La détection du signal lumière est faite soit en exposant la membrane à un film photographique ou à l'aide d'une camera CCD. En cas de détection par fluorescence, le signal de fluorescence est détecté directement à l'aide d'un scanner à laser ou à l'aide d'une camera CCD adaptée pour ce type de détection.

Le résultat de quantification obtenu par WB est lié fortement à la qualité des standards (protéines purifiées, dégradation), des anticorps (spécificité) et de la méthode de détection

(linéarité, saturation). De plus le WB est assez laborieux, dépend de la qualité du gel préparé et une seule protéine peut être quantifiée par test.

2.5 RT-qPCR

La réaction de transcription inverse (reverse transcription, RT) suivie d'une (polymerase chain reaction) PCR quantitative en temps réel (qPCR) est une technique spécifique, sensible, qui permet de doser l'acide ribonucléique messager (ARNm) mais pas la protéine elle-même. Cette approche a un large spectre d'application dans les diagnostics cliniques (Gao *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2013).

La RT-qPCR n'est donc qu'une approche indirecte d'évaluer la quantité de protéine mais la relation ARN/protéine est souvent mauvaise (Anderson and Seilhamer, 1997; Chen *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2004).

Plusieurs facteurs peuvent influencer une absence de corrélation entre l'expression de l'ARNm et la protéine comme les régulations post-transcriptionnelles, traductionnelles ou post-traductionnelles (Wu *et al.*, 2008).

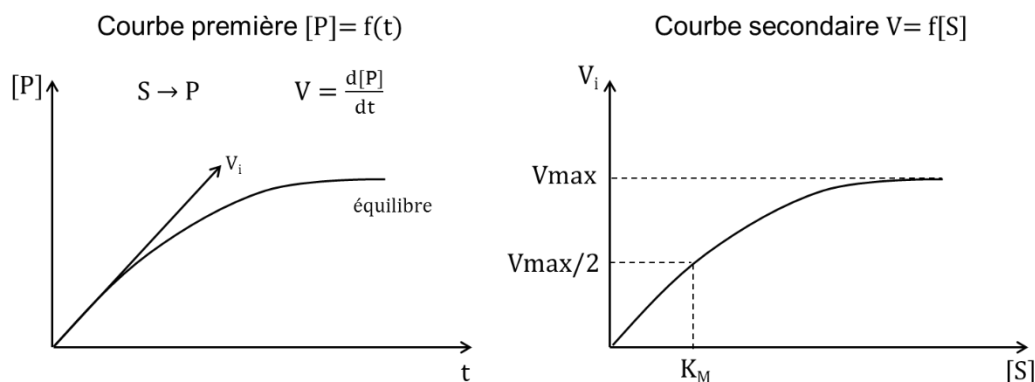
2.6 Activité enzymatique

Quand une protéine présente des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique, elle est appelée enzyme. Généralement, afin d'évaluer la quantité d'un enzyme, on détermine son activité enzymatique. L'activité enzymatique exprime la quantité de substrat catalysée ou la quantité de produit formé par unité de temps.

Plusieurs facteurs peuvent avoir des effets sur l'activité enzymatique comme la température, le pH, les activateurs et les inhibiteurs. Certaines enzymes peuvent agir seules, d'autres nécessitent la présence d'un cofacteur.

Pour étudier les réactions catalysées par une enzyme, on doit étudier la cinétique enzymatique. On s'intéresse à la vitesse initiale de la réaction, c'est-à-dire pendant la phase linéaire de la réaction.





Cette vitesse obéit à l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

où E : enzyme, K_M : constante de Michaelis-Menten, S : substrat, P produit formé, V : vitesse initiale, V_{\max} : vitesse maximale de l'enzyme.

La K_M est la concentration de substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction enzymatique a atteint la moitié de la vitesse maximale (V_{\max}) (K_M est la concentration de substrat pour laquelle la moitié des sites actifs sont occupés). Elle est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Les méthodes de dosage enzymatique consistent à mesurer la variation de la quantité de substrat consommée ou de produit formé sur une période de temps. Les quantités de substrats ou de produits sont généralement mesurées par spectrophotométrie ou comptage de radioactivité, et pour certains cas par HPLC-UV ou HPLC-MS.

Il existe deux approches de base pour mesurer les activités enzymatiques : les méthodes à temps fixe et les cinétiques.

Les approches cinétiques consistent à prélever à intervalle de temps des échantillons d'une réaction. On mesure ensuite les changements de concentration du produit formé permettant ainsi d'accéder à la vitesse de la réaction qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme ($v = k[E_t]$) où E_t est l'enzyme totale.

L'approche à temps fixe consiste essentiellement à incuber les différents composés d'une réaction durant un temps précis. A la fin de l'incubation, on mesure la quantité du substrat ou du produit formé. On pourra alors calculer la variation de la concentration par rapport à celle mesurée au début de la réaction (t_0), puis, sachant la durée de l'incubation, la vitesse de la réaction est déterminée.

L'activité enzymatique est une approche indirecte qui nécessite des conditions spécifiques ; une concentration saturante de substrat, limiter la durée de réaction (pour être en condition de vitesse initiale où la quantité de produit formé est proportionnelle au temps, phase linéaire) et contrôler l'environnement (pH,...). De plus, la difficulté de trouver un substrat (ou un inhibiteur) spécifique de l'enzyme est l'une des limitations de cette approche en particulier dans le cas de la super famille des CYPs).

2.7 Dosage de protéines par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est un outil analytique puissant qui est devenu indispensable en protéomique qualitative mais aussi quantitative en terme de sélectivité et de sensibilité (Patterson and Aebersold, 2003; Aebersold *et al.*, 2013). L'utilisation de la spectrométrie de masse dans le domaine de protéomique (Targeted proteomics) a été reconnue par la revue « Nature Methods » comme la méthode de l'année 2012 (Anonymous, 2013). Cette technologie sera décrite en détail dans la partie 3 (Technologie LC-MS).

Il y a deux approches pour analyser les protéines (qualitative ou quantitative) par spectrométrie de masse (Figure 6) : « top-Down » et « bottom-up ». Dans l'approche top-down, la masse exacte de la molécule intacte (protéine) est mesurée par un MS à haute résolution. Certains états de charges sont sélectionnés et soumis à une fragmentation afin d'obtenir des informations de séquence et une identification. Cette approche est utilisée pour caractériser les différentes isoformes et les modifications post-traductionnelle (MPTs) et moins développée pour la quantification (Tipton *et al.*, 2011; Collier and Muddiman, 2012). Pour l'approche bottom-up, les mélanges complexes de protéines sont digérés, les peptides sont séparés par chromatographie liquide à polarité de phase inversée (HPLC) puis détectés par spectrométrie de masse. Les protéines sont ensuite identifiées et quantifiées au niveau peptidique.

La quantification des protéines par spectrométrie de masse est soit relative pour comparer le protéome entre deux échantillons, soit absolue pour déterminer la quantité exacte d'une protéine d'intérêt dans des échantillons. Deux approches principales sont utilisées pour la quantification des protéines par spectrométrie de masse :

- Introduire un analogue de cible (protéine ou peptide) marqué avec des isotopes stables (^2H , ^{13}C , ^{15}N ou ^{18}O) avant l'analyse par spectrométrie de masse afin de réaliser une quantification relative ou absolue. L'introduction du marqueur isotopique peut être réalisée par un marquage métabolique, chimique ou enzymatique.
- soit en comparant la quantité relative entre deux échantillons en utilisant l'approche sans marquage « label-free ».

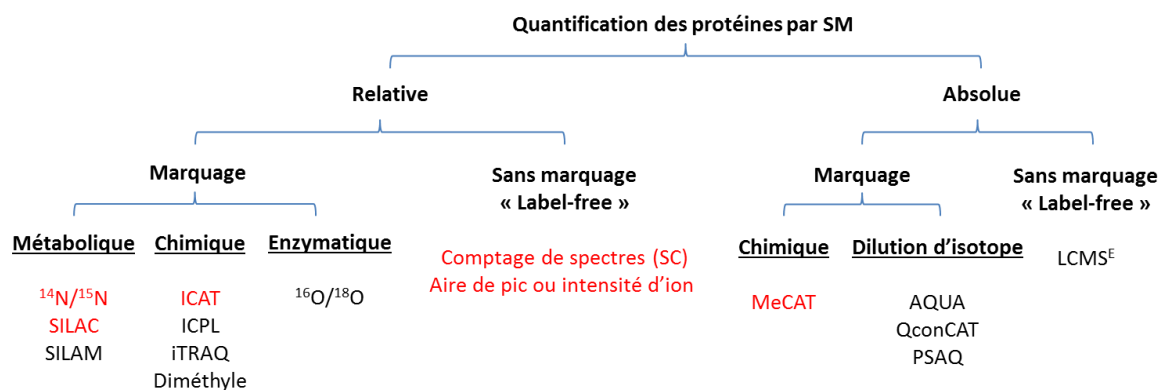


Figure (6) Les principales méthodes de quantification des protéines par spectrométrie de masse.

En rouge, méthodes appliquées sur des protéines intactes (top-down) ou sur des peptides (bottom-up), en noir, méthodes bottom-up. ICAT : Isotope-coded affinity tags, ICPL : isotope-coded protein label, SILAC : stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture, SILAM : stable isotope labeling of mammals, iTRAQ: Isobaric tag for relative and absolute quantitation, MeCAT: Metal-Coded affinity Tagging, AQUA: Absolute quantification, TMT: tandem mass tags, QconCAT: Quantification concatamer, PSAQ: Protein Standard Absolute Quantification

Les différentes méthodes développées dans chaque approche seront détaillées ci-dessous et chaque méthode sera discutée séparément.

2.7.1 Marquage métabolique

Des nutriments hautement enrichis avec des isotopes stables sont fournis à des cellules en culture (ou des animaux), et ces isotopes marqués sont incorporés dans toutes les protéines cellulaires en même temps. Il y a deux approches :

Milieu riche en ^{15}N : Cette approche consiste à cultiver les cellules à marquer dans un milieu de croissance qui contient une source de ^{15}N (chlorure ou sulfate d'ammonium ^{15}N). Pour chaque division cellulaire, le nombre d'atomes ^{15}N incorporés dans les cellules est augmenté jusqu'à saturation.

Pour comparer deux échantillons, l'un est cultivé sur milieu ^{14}N et l'autre sur milieu enrichi ^{15}N . Dans la deuxième étape, les deux échantillons sont mélangés et digérés, puis les peptides issus de la digestion sont analysés par spectrométrie de masse et le ratio des pics est calculé (Oda *et al.*, 1999).

Acides aminés marqués : Dans cette approche, les cellules sont marquées en leur fournissant des nutriments contenant des acides aminés marqués par un nombre précis d'isotopes stables (^{15}N ou ^2H). On ne peut utiliser que les acides aminés essentiels pour la

cellule, c'est-à-dire ceux qui ne sont pas métabolisés dans la cellule en un autre acide aminé. Cette approche, appelée SILAC (stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture), est améliorée ensuite en utilisant l'arginine et la lysine marquées en ^{13}C (Ong *et al.*, 2002, 2003). Le marquage en ^{13}C , à l'inverse du marquage en ^2H , ne produit pas une différence de temps de rétention par rapport à l'isotope léger. En effet, le marquage en deutérium réduit légèrement l'hydrophobicité des espèces marquées par rapport à l'hydrogène et par conséquent produit des changements de temps de rétention en phase inverse. La différence de temps de rétention entre les espèces lourdes et légères augmente en augmentant le nombre de deutérium dans le marquage (Zhang *et al.*, 2001). Le marquage de l'arginine et de la lysine assure que tous les peptides tryptiques sont marqués et en conséquence augmente le nombre de peptides quantifiables (Ong *et al.*, 2003).

Ce marquage est effectué très tôt lors de la première étape d'extraction/digestion ce qui évite les erreurs accumulées pendant les différentes étapes de préparation de l'échantillon. La principale limite du marquage métabolique est qu'il est applicable aux cultures cellulaires et ne peut être facilement étendu à des études cliniques ou animales.

Une application du marquage métabolique a été développée afin d'introduire l'isotope stable par un régime enrichi en ^{15}N dans les protéines de *Rattus norvegicus* (SILAM, stable isotope labeling of mammals) (Wu *et al.*, 2004). La méthode SILAM est proposée comme outil pour quantifier globalement les protéines à partir de tissus de mammifères et pour mesurer les changements en protéome en réponse à un médicament.

2.7.2 Marquage chimique

Plusieurs stratégies d'étiquetage (tags) ont été développées par modification chimique des groupes fonctionnels de certains résidus d'acides aminés dans des protéines ou des peptides (Figure 7) :

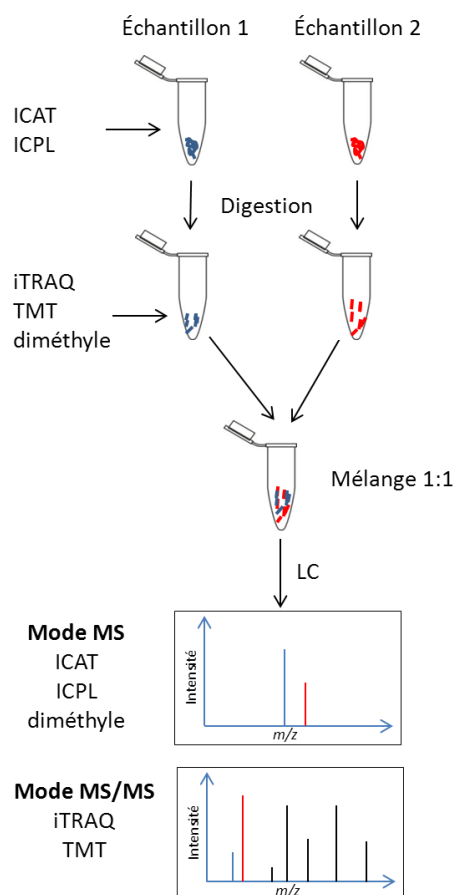


Figure (7) Le marquage chimique de protéines.

ICAT et ICPL sont effectués avant la digestion des protéines. TMT, iTRAQ ou diméthyle sont effectués au niveau peptidique (le marquage par iTRAQ peut être réalisé avant la digestion au niveau protéique (Wiese *et al.*, 2007)). Pour ICAT, ICPL et diméthyle, la masse du même peptide marqué est différente en mode MS tandis que la fragmentation du peptide marqué par TMT ou iTRAQ donne des fragments dits rapporteurs différents qui permettent la quantification de ce peptide dans des différents échantillons.

ICAT (Isotope-coded affinity tags) : Cette technique a été développée par Gygi *et al.* (Gygi *et al.*, 1999), deux échantillons sont marqués avec des tags chimiquement identiques qui ne diffèrent que par leur composition isotopique (lourd et léger) et contiennent un groupement thiol-réactif (qui fait une liaison covalente avec le thiol de la cystéine comme l'iodoacétamide) et un groupement biotine pour faciliter la purification par affinité (Figure 8). Les échantillons sont mélangés, digérés, et les peptides marqués sont sélectivement enrichis par chromatographie d'affinité. Enfin, les peptides marqués ICAT sont quantifiés par spectrométrie de masse. Les peptides sont identifiés à partir des spectres MS/MS et les abondances relatives des peptides légers et lourds sont déterminées à partir des spectres MS. Cette technique permet de simplifier les échantillons complexes en ne marquant et sélectionnant

que les peptides ayant au moins une cystéine, d'autre part cela est considéré comme une limitation puisque les résidus cystéine sont rares ; il faut de plus disposer d'un peptide protéotypique contenant la cystéine et détectable en LC-ESI. De plus, la méthode n'est pas applicable au dosage de MPT quand la MPT est présente sur un peptide qui ne contient pas de cystéine (Patton *et al.*, 2002).

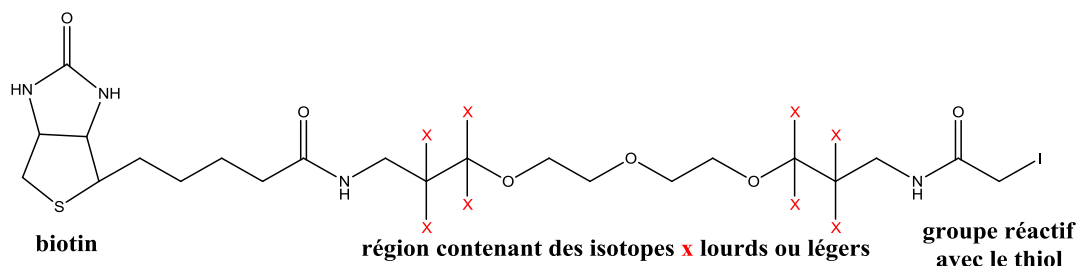


Figure (8) ICAT tag d'après (Peng and Gygi, 2001)

Les deux formes légère et lourde du tag se différencient entre elles par 8 Da issus de huit ^1H ou ^2H . Les ^2H ont été remplacés par des ^{13}C ou ^{15}N afin d'éviter la différence de temps de rétention en chromatographie (Zhang and Regnier, 2002).

ICPL (isotope-coded protein label): C'est un développement plus récent de la méthode ICAT basé sur un marquage isotopique de tous les groupes amino libres des protéines (lysine et N-terminal non bloqué) (Schmidt *et al.*, 2005) (Figure 9). Les protéines sont réduites, alkylées et puis marquées. L'ICPL a dépassé certaines limitations de l'ICAT puisque les groupes amines libres sont nombreux et donc plusieurs peptides marqués sont disponibles pour quantifier une protéine. De plus, l'ICPL permet d'analyser plus de MPTs par rapport à l'ICAT. La différence entre le peptide marqué et non marqué varie selon la séquence ce qui rend l'interprétation automatique compliquée.

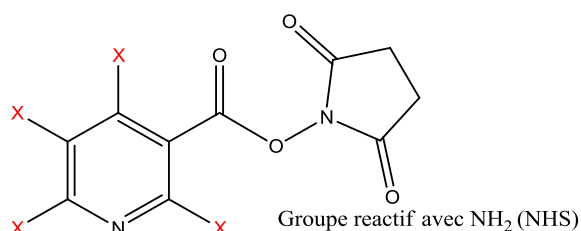


Figure (9) ICPL tag d'après (Schmidt *et al.*, 2005)

Nicotinoyloxy-succinimide (Nic-NHS), X = ^1H (marquage léger) ou ^2H (marquage lourd)

iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation) : Dans cette approche, il n'y a pas de différence de masse entre les peptides marqués. Par contre, les ions rapporteurs générés par la fragmentation des peptides marqués ont des masses différentes qui permettent la quantification relative entre les échantillons (Figure 10.C). Chaque réactif est composé d'un groupe rapporteur chargé qui est unique à chacun des quatre réactifs, un groupe peptidique réactif (amine spécifique), et un groupe d'équilibrage pour maintenir une masse totale de 145 Da (Figure 10.A-B). Cette technique est onéreuse à grande échelle. De plus, elle n'est pas compatible avec l'utilisation de gel comme une étape d'enrichissement car le groupe réactif des peptides (PRG) réagit avec les groupes aminés des réactifs du gel (e.g. acrylamide, tampon Tris et bicarbonate d'ammonium).

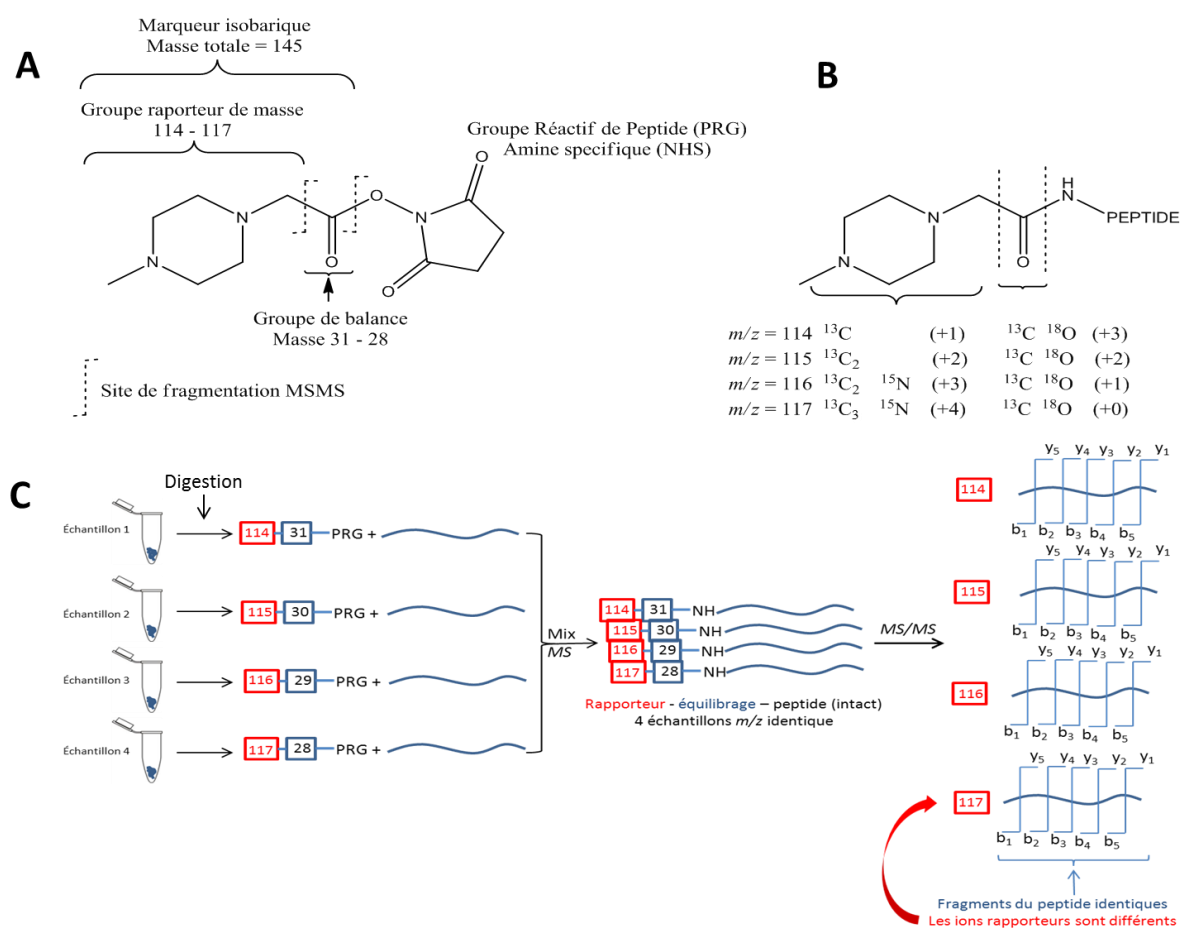


Figure (10) Méthodologie iTRAQ d'après (Ross, 2004)

Le réactif iTRAQ se compose d'un groupe rapporteur (sur la base de la N-méthylpipérazine), un groupe d'équilibrage de masse (carbonyle), et un groupe réactif avec le peptide (NHS-ester) (Figure 10.A). La masse globale du tag isobarique est maintenue constante à l'aide d'enrichissement isotopique différentielle avec des atomes ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O .

Les masses des groupes rapporteurs varient de 114,1 à 117,1 Da tandis que les masses des groupes d'équilibre varient de 28 à 31 Da afin de maintenir les masses des différents tags à 145,1 Da (Figure 10.B). Lorsqu'il réagit avec un peptide, le tag forme une liaison amide avec un groupe aminé (N-terminal ou la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine). Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de centres enrichi dans chaque section de la molécule. Les quatre différents échantillons qui ont le même peptide, sont réduits, alkylés et digérés par la trypsine puis sont marqués chacun avec l'un des réactifs. Le complexe réactif-peptide a le même rapport m/z en mode MS tandis qu'en mode MS/MS, il se fragmente en donnant des ions rapporteurs différents (Figure 10.C) (Ross, 2004).

Le marquage par le diméthyle: C'est une autre méthode de marquage chimique de tous les groupes amine libres des protéines où les peptides issus de la digestion de différents échantillons sont marqués avec différents tags de diméthyle marqués par des isotopes stables (Boersema *et al.*, 2009). Les échantillons marqués sont mélangés et analysés simultanément par LC-MS durant laquelle la différence de masse des marqueurs de diméthyle est utilisée pour comparer l'abondance des peptides dans les différents échantillons. Cette méthode est rapide et moins chère par rapport à l'iTRAQ.

TMT (tandem mass tags): C'est une autre méthode de marquage chimique isobarique par des tags de Guanidino-NHS Ester (Thompson *et al.*, 2003). Comme dans le cas d'iTRAQ, le marquage est sur le N-terminal ou le groupe amine de la lysine. Le peptide, modifié par différents marqueurs, a la même masse. Les fragments TMT, en mode MS/MS, sont utilisés pour différencier le peptide dans les différents échantillons.

MeCAT (Metal-Coded affinity Tagging) : C'est une autre méthode de marquage chimique des peptides et des protéines par des métaux rares (lanthanide) en utilisant la spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS). Ce type de source permet le dosage sensible et sélectif des hétéroatomes (tous les éléments sauf C, H, N et O) présents naturellement dans les protéines (S, P, Se et métaux) ou les lanthanides introduits par le marquage. La méthode MeCAT a été appliquée pour la quantification absolue des protéines en top-down et bottom-up (Bergmann *et al.*, 2012).

La technique ICP-MS a aussi été appliquée sur des acides aminés purs, des peptides et des protéine en utilisant un marquage à l'iode pour la tyrosine (Pereira Navaza *et al.*, 2009) ou sans marquage en quantifiant le soufre S des méthionines et cystéines ou le phosphore pour la phosphorylation (Fernández *et al.*, 2012). Cette technique permet de réaliser une quantification absolue et sensible.

Le marquage chimique par un tag d'isotope stable sur une phase solide: Le tag se compose d'un linker photo clivable, une leucine qui contient soit sept H (d0) soit sept deutériums (d7) et un groupe réactif avec le thiol de la cystéine (Zhou *et al.*, 2002) (figure 11).

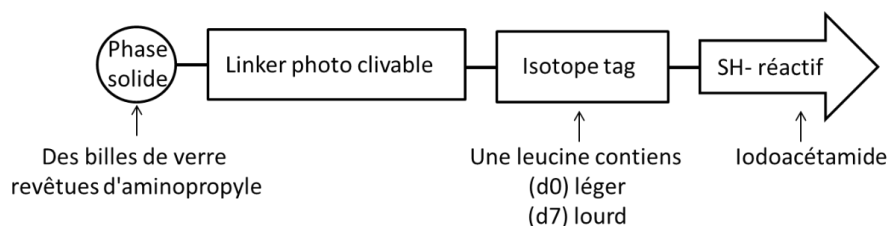


Figure (11) Le tag d'isotope stable sur une phase solide d'après (Zhou *et al.*, 2002).

Après avoir été digérés, les peptides sont marqués avec un tag léger ou lourd ensuite les deux échantillons sont mélangés, les linkers sont clivés par l'UV et enfin les peptides sont analysés par μ LC-MS/MS afin de déterminer la séquence et la quantité relative de chaque peptide. Cette méthode a été comparée avec l'ICAT pour détecter le changement du protéome induit par le galactose dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. (Zhou *et al.*, 2002) Elle est relativement plus simple (automatisation), plus efficace (reproductibilité) et plus sensible.

Les différentes méthodes utilisant le marquage chimique permettent de réaliser une quantification relative (en général) avec des étapes de préparation et d'interprétations dans certains cas compliquées. Ces approches ne permettent pas dans la plupart des cas une quantification absolue.

2.7.3 Marquage enzymatique (^{18}O)

Cette technique simple est peu onéreuse et consiste à incorporer l'isotope lourd de l'oxygène ^{18}O à l'aide de l'enzyme de digestion sur le C-terminal des peptides hydrolysés issus de la digestion. La quantité relative d'une protéine dans deux échantillons différents est déterminée en digérant l'un dans un milieu contenant H_2^{16}O et l'autre dans un milieu contenant H_2^{18}O (Fenselau and Yao, 2007) (Figure 12). Les mêmes peptides générés d'une protéine dans les deux échantillons se différencient par 2 Da quand un seul atome de ^{18}O est incorporé et par 4 Da dans le cas de deux atomes ^{18}O .

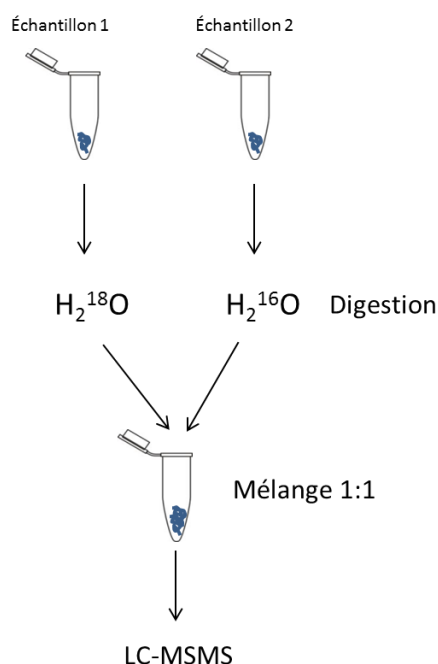


Figure (12) Un schéma représente la technique du marquage enzymatique.

Un échantillon est digéré en présence d'eau légère ($H_2^{16}O$), l'autre est digéré en présence d'eau lourde ($H_2^{18}O$). Les échantillons sont mélangés avant analyse.

En cas d'un seul atome ^{18}O , la quantification est délicate car la différence de masse de 2 Da entre le peptide marqué et non marqué est petite. Les deux massifs isotopiques sont superposés et une incorporation du deuxième atome ^{18}O simplifie la détection et la quantification des doublets de peptides. Le taux d'incorporation d'un ou de deux ^{18}O est dépendant de la séquence du peptide et de la pureté de $H_2^{18}O$ et l'incorporation complète d'un ou de deux ^{18}O nécessite une optimisation de la digestion (Miyagi and Rao, 2007).

2.7.4 Couplage immunochimie-MS

Cette approche consiste à utiliser des anticorps anti-peptide ou anti-protéine pour enrichir les protéines d'intérêts afin d'être analysées en MS. Elle couple la sélectivité et la sensibilité du test immunologique et de la spectrométrie de masse pour détecter et quantifier les protéines de faible abondance.

SISCAPA (Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies) est une méthode qui utilise des anticorps polyclonaux anti-peptide pour capturer les peptides et ses analogues marqués par un isotope stable ajoutés en quantité connue après la digestion. Les peptides naturels et marqués enrichis sont ensuite élués et analysés par ESI-MS en mode SRM (Anderson *et al.*, 2004). Cette méthode est considérée plus rapide et plus efficace par rapport à l'ELISA. Elle présente plusieurs avantages : l'utilisation d'un seul anticorps et la

possibilité de détecter et quantifier plusieurs cibles en une seule prise. La sélectivité assurée par la spectrométrie de masse permet de compenser la sélectivité croisée de l'anticorps.

L'anticorps anti-peptide peut être marqué par des métaux rares et analysé après l'étape d'enrichissement par ICP-MS. L'utilisation de l'ICP-MS dans les tests immunologiques en utilisant des antigènes ou des anticorps marqués par un élément (iode ou lanthanide) a été décrite (Hu *et al.*, 2007).

Cette technique du couplage immuno-MS est limitée comme les méthodes immunologiques par la spécificité de l'anticorps et nécessite dans certains cas des équipements spécifiques (ICP-MS).

2.7.5 Dilution par des isotopes stables

Quand la protéine d'intérêt est connue (quantification ciblée), cette méthode est la méthode de choix puisqu'elle détermine la quantité absolue de la protéine dans l'échantillon. La méthode AQUA (Absolute quantification) utilise un peptide de référence marqué par un isotope stable ^{13}C et ^{15}N , conduisant à une différence de masse avec le peptide endogène. Ce peptide marqué a la même séquence en acides aminés que le peptide endogène et élue au même temps de rétention. Les peptides marqués sont ajoutés après la digestion et le ratio entre les peptides non marqué et marqué est utilisé afin de quantifier la protéine.

Quand une méthode AQUA est développée, il faut respecter 3 étapes clés : le choix des peptides de références, l'optimisation de l'analyse en MS et l'étape de la digestion.

Le choix du peptide de référence est une étape cruciale. Le peptide de référence doit avoir une séquence spécifique dite « protéotypique » pour la protéine à quantifier et respecter certains critères résumés dans le tableau (2). Plusieurs stratégies ont été appliquées pour sélectionner les peptides protéotypiques (PPs) qui seront discutées dans le chapitre résultat.

Tableau (2) Les critères de sélection les peptides protéotypiques pour la méthode AQUA d'après (Kamii *et al.*, 2008)

Critères de sélection	
Détection par spectrométrie de masse	Longueur comprise entre 6 et 16 acides aminés Pas de modification post-traductionnelle (MPT) Pas de polymorphisme nucléotidique (SNP)
Digestion par la trypsine	Pas de région transmembranaire Aucune coupure partielle (missed cleavage)
Stabilité du peptide	Aucun résidu méthionine ou cystéine
Critères de seconde sélection	Longueur comprise entre 8 et 10 acides aminés Aucun résidu histidine

Langenfeld *et al.* ont ajouté des critères au niveau de la séquence : Les résidus proline multipliés ont été considérés comme défavorables pour la synthèse; Asp-Gly (DG) et Asn-Gly (NG) sont à éviter à cause de leur sensibilité à l'auto dégradation (Langenfeld *et al.*, 2009). Seibert *et al.* ont ajouté que les résidus réactifs (C,M et W) et les séquences non stables (NG, Q ou N à N-terminal) sont aussi à éviter (Seibert *et al.*, 2009).

Malgré ces critères de sélection, certains peptides synthétisés n'ont pas l'intensité de signal suffisante ou ne sont pas détectés par la spectrométrie de masse (problème de digestion, faible ionisation ou adsorption sur les matériels). Les peptides marqués par un isotope stable sont disponibles commercialement (délai de 2 mois) mais ils sont onéreux (environ 800 euros par peptide). Il est aussi possible d'incorporer une modification post traductionnelle (MPT). Chaque peptide marqué est utilisé pour quantifier un seul peptide de la protéine, donc il est exigé d'utiliser plusieurs peptides répartis sur l'ensemble de la séquence de la protéine afin d'avoir une quantification fidèle et cela augmente le coût. Les peptides AQUA, chimiquement synthétisés, peuvent avoir des problèmes de solubilisation, adsorption et conservation (séquence dépendant). Ils sont ajoutés à la dernière étape car ils sont incompatibles avec les étapes de purification. Enfin, la méthode AQUA nécessite une digestion complète pour garantir une quantification fidèle.

Afin de résoudre les problèmes rencontrés avec les peptides AQUA, plusieurs techniques ont été proposées pour avoir des peptides protéotypiques adaptés à la quantification absolue.

En 2005, Beynon *et al.* ont généré une protéine de synthèse (QconCAT) (quantification concatamer) qui est un ensemble des peptides tryptiques pour plusieurs protéines (Beynon *et al.*, 2005; Pratt *et al.*, 2006). Un plasmide contenant un gène artificiel codant pour les peptides protéotypiques des protéines d'intérêts est surexprimé dans E.Coli en milieu enrichi en ^{15}N ou en présence d'acides aminés marqués [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$] L-lysine and [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$] L-arginine (Brun *et al.*, 2007). La protéine QconCAT est ensuite purifiée, sa concentration déterminée et enfin ajoutée avant l'étape de digestion trypsique pour produire les peptides marqués comme la méthode AQUA.

L'avantage de cette approche est dès que le gène est cloné, la protéine peut être produite, marquée et quantifiée à la demande. La protéine QconCAT est ajoutée avant la digestion permettant d'avoir plusieurs peptides marqués pour une protéine cible. Cette approche n'est pas adaptée à l'analyse des MPTs et elle nécessite une digestion complète. Une sensibilité différente aux protéases est remarquée entre la protéine QconCAT et la protéine cible (Rivers *et al.*, 2007).

Brun *et al.* ont développé en 2007 la stratégie appelée PSAQ (Protein Standard Absolute Quantification) basée sur l'utilisation d'une protéine recombinante marquée identique à la

protéine d'intérêt comme étalon interne (Brun *et al.*, 2007), l'ensemble de la protéine est exprimée dans un organisme hôte qui est cultivé sous les mêmes conditions que pour la production de QconCAT. Cet étalon interne ajouté en quantité connue dès la première étape de préparation représente un étalon idéal qui permet d'éviter tous les problèmes rencontrés en cas de l'utilisation des méthodes AQUA et QconCAT pendant les différentes étapes de préparation (purification, digestion) (Figure 13). De plus, tous les peptides protéotypiques d'une protéine sont marqués ce qui améliore la couverture de la séquence et la fidélité de la quantification.

Par contre, cette approche n'est pas adaptée à l'analyse des MPTs. Pour chaque protéine à quantifier, une protéine standard est nécessaire : coût élevé et difficulté de produire la protéine (laborieuse). L'expression hétérologue de certaines protéines est encore difficile (e.g. CYP3A43) (Daly, 2006).

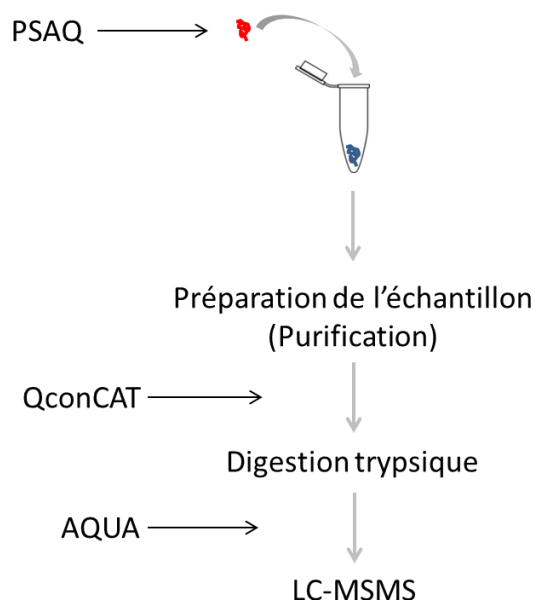


Figure (13) Les stratégies de la quantification absolue des protéines en utilisant la dilution d'isotope :

- PSAQ (protéine marquée) est ajouté tôt à la première étape de préparation de l'échantillon
- QconCAT (protéine de synthèse contient des peptides marqués pour différentes protéines cibles) est ajouté juste avant la digestion
- AQUA (peptide marqué) est ajouté après la digestion

2.7.6 Quantification sans marquage (label-free)

Cette méthode est considérée comme une alternative simple et moins onéreuse aux techniques de marquage puisque elle n'a pas besoin d'un étalon marqué et nécessite moins

de manipulation de l'échantillon. En outre, les progrès de l'instrumentation en spectrométrie de masse au niveau de la sensibilité, de la vitesse d'enregistrement des spectres et de la mesure de masse exacte à haute résolution, permettant l'interrogation plus profonde des échantillons complexes (protéines à faible abondance), rendent la quantification sans marquage LC-MS une approche très attrayante pour l'analyse quantitative des échantillons biologiques.

Cette technique permet d'identifier et d'estimer la quantité d'un grand nombre de protéines simultanément et par conséquent d'étudier le changement de profil global en protéines entre deux échantillons différents (e.g. sain et tumoral). Cet avantage est utilisé pour la découverte des nouveaux biomarqueurs protéiques et métabolique (Wang *et al.*, 2003).

Deux stratégies sont décrites pour l'approche sans marquage : le comptage de spectres (SC) et l'intensité de signal MS ou l'aire du pic chromatographique (EIC) (Figure 14).

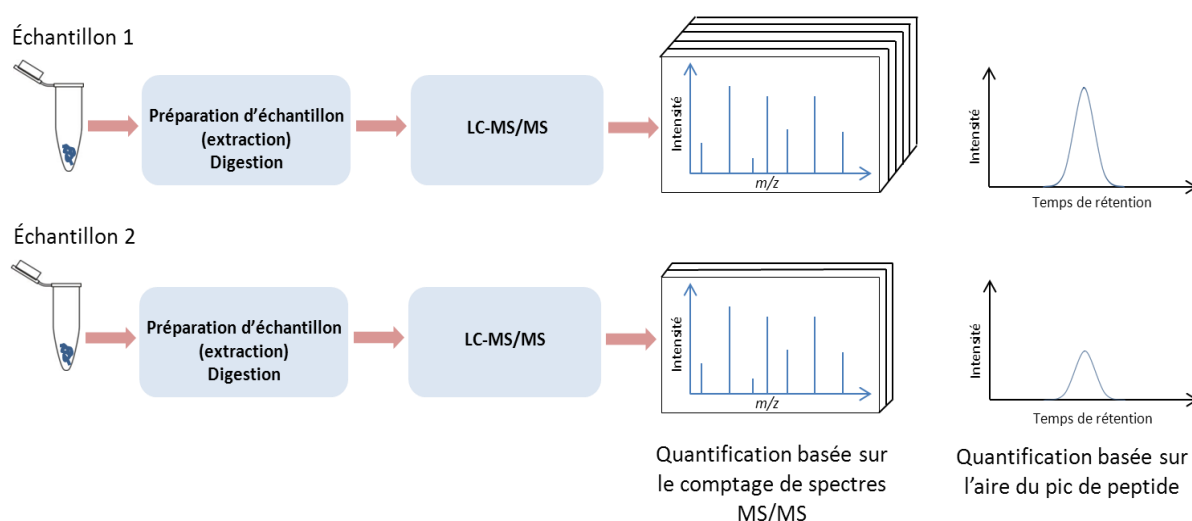


Figure (14) Les deux principales stratégies de quantification sans marquage.

Le comptage de spectres (SC) implique le comptage et la comparaison du nombre de spectres MS/MS des ions précurseurs (peptides) fragmentés identifiés pour une protéine donnée. Le SC est fondé sur l'idée que plus la protéine est abondante plus ses peptides sont identifiés et fragmentés en mode MS/MS.

La seconde stratégie utilise l'aire du pic chromatographique (EIC) ou l'intensité de signal de l'ion précurseur en MS à un temps de rétention précis pour quantifier la protéine correspondante. Cette stratégie est fondée sur l'idée que l'intensité du signal généré pour un

ion dans la source ESI est proportionnelle à sa concentration. Les échantillons analysés par cette stratégie doivent être normalisés par rapport à un étalon interne.

Deux niveaux de normalisation peuvent être pris en compte : une normalisation technique visant à compenser les changements à long terme du système LC-ESI-MS, et une normalisation d'échantillon biologique analysé. Une normalisation technique peut être une protéine ajoutée avant la digestion ou des peptides en quantité connue dont les temps de rétention couvrent une grande partie du gradient LC. Une normalisation d'échantillon peut être faite par la sélection d'une protéine dont la concentration est supposée être constante entre les échantillons (Wang *et al.*, 2003).

Silva *et al.* ont développé une méthode de quantification absolue sans marquage en utilisant l'approche LCMS^E (détaillée à la fin de la partie 3 de l'introduction ; technologies LC-MS), (Silva *et al.*, 2006). Une protéine standard ajoutée à une quantité connue est utilisée pour déterminer un facteur de réponse universel (SR/pmol de protéine), qui est ensuite appliqué aux autres protéines identifiées dans le mélange pour déterminer leur concentration absolue. Ce facteur est calculé en divisant la moyenne de l'intensité des trois peptides les plus intenses observés par la quantité en pmol de la protéine standard ajoutée. La quantité absolue de chaque protéine identifiée dans le mélange est déterminée en divisant la moyenne de l'intensité du signal MS de ses trois peptides les plus intenses par le facteur de réponse universel. Cette méthode a été validée dans des échantillons complexes (mélange de protéines ajoutée dans le sérum humain) (Levin *et al.*, 2011).

L'index d'abondance de protéine (PAI), défini par le nombre de peptides observés divisé par le nombre des peptides observables théoriquement, a été utilisé pour quantifier relativement les protéines (Rappsilber *et al.*, 2002). Cette méthode est fondée sur l'idée que plus la concentration de protéine est élevée plus le nombre de peptides identifiés est grand. La méthode a été améliorée en utilisant la valeur $10^{\text{PAI}-1}$ qui est proportionnelle à la concentration de protéine dans un mélange. Cette valeur est appelée emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) (Ishihama *et al.*, 2005).

La grande quantité d'information acquise lors de ce type d'analyse nécessite des traitements spécifiques (normalisation, modèles statistiques). Plusieurs logiciels ont été développés ou sont en cours de développement afin de traiter ces données (SIEVE ; Thermo Scientific, Scaffold ; Proteom Software, Inc) (Nahnsen *et al.*, 2013). Les méthodes de quantification sans marquage permettent en général de réaliser une quantification relative de toutes les protéines dans un échantillon (quand elles sont détectées avec un bon signal) sans présélection. L'utilisation de l'une des méthodes de quantification absolue décrites précédemment

(utilisation d'un analogue marqué) reste (d'après certaines références) indispensable pour déterminer une quantité plus précise d'une protéine dans un échantillon.

2.7.7 Modes d'acquisition en spectrométrie de masse utilisés pour la quantification des protéines

Plusieurs modes d'acquisitions sont utilisés pour la quantification des protéines. Cet aspect sera détaillé à la fin de la partie 3 de l'introduction (technologies LC-MS).

Pour conclure, différentes techniques sont développées et utilisées pour la quantification des protéines totales (méthodes colorimétriques) et des protéines spécifiques purifiées ou dans des échantillons complexes (méthodes immunologiques, spectrométrie de masse). Ces techniques ont été évaluées avec le temps afin d'améliorer leur sensibilité et en surmonter les faiblesses. La spectrométrie de masse présente la technique la plus prometteuse en termes de développement (sensibilité, sélectivité, automatisation).

Des avantages et des limites pour les principales approches utilisées pour la quantification des protéines sont présentées dans le tableau (3).

Tableau (3) Principales approches utilisées pour la quantification des protéines (avantages et limites).

	Teste immunologique	Activité	Spectrométrie de masse
Avantages	Rapidité (ELISA)	Forme active	Sélectivité PMT Possibilité de distinguer entre les isoformes (SNPs) Dosage simultané de grand nombre de protéines
Limites	Nécessité de protéine purifiée pour les standards et la préparation de l'Ac Difficulté de produire un Ac spécifique Sélectivité croisée PMT peuvent influencer la réaction avec l'Ac Temps et coût de développement élevés (Ac) Semi-quantitative (WB) Range dynamique limité (saturation) Impossible de vérifier la spécificité (ELISA)	Nécessité de substrat ou inhibiteur spécifique Indirecte Sensible à l'environnement (inhibiteur, pH) PMT peuvent influencer l'activité Variabilité d'activité <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>	Coût de technologie (maintenance, stockage des données, logiciel de traitement) Forme active ou pas Temps d'analyse (un échantillon à la fois)

2.8 Méthodes de dosage des CYPs

Dès la découverte du rôle des CYPs, la caractérisation et le dosage de ces protéines sont apparus comme une question cruciale étant donné leur importance dans le métabolisme des xénobiotiques et de certains endobiotiques souvent hydrophobes. La forte homologie de séquences entre ces protéines fait de la distinction de ces différentes isoformes un véritable challenge.

Les méthodes utilisées pour déterminer le profil d'expression des CYPs dans les différents tissus, cultures ou organismes sont des méthodes indirectes comme la qPCR pour quantifier les ARNm de CYPs ou comme les tests enzymatiques pour déterminer l'activité de la forme active des CYPs (holoprotéine uniquement). En ce qui concerne les méthodes directes, les tests immunologiques en particulier, les WB sont les plus utilisés pour doser l'intégralité de la protéine de CYP (apoprotéine totale). A partir de 2003, la spectrométrie de masse a été utilisée pour quantifier les CYPs (protéines entières) car c'est une méthode à la fois sensible et sélective.

2.8.1 L'état de l'art

Dans cette partie, toutes les méthodes utilisées pour déterminer le profil d'expression des CYPs, existant avant le début de ma thèse, sont décrites.

2.8.1.1 Dosage des CYPs totaux (*spectre différentiel de l'hème- monoxyde de carbone*)

La nature hémoprotéique de ces protéines a été utilisée pour déterminer la quantité totale des CYPs puisque leurs formes ferreuses (réduites par exemple par le dithionite de sodium) réagissent avec le monoxyde de carbone (CO) pour former un complexe dont le maximum d'absorption apparaît spécifiquement à la longueur d'onde 450 nm (bande de Soret), signature spécifique du ligand axial du groupement thiol d'une cystéine avec le fer de l'hème dans ces protéines (Omura and Sato, 1964). La différence d'absorption, avant et après ajout de CO, est mesurée entre 400 et 550 nm (Figure 17).

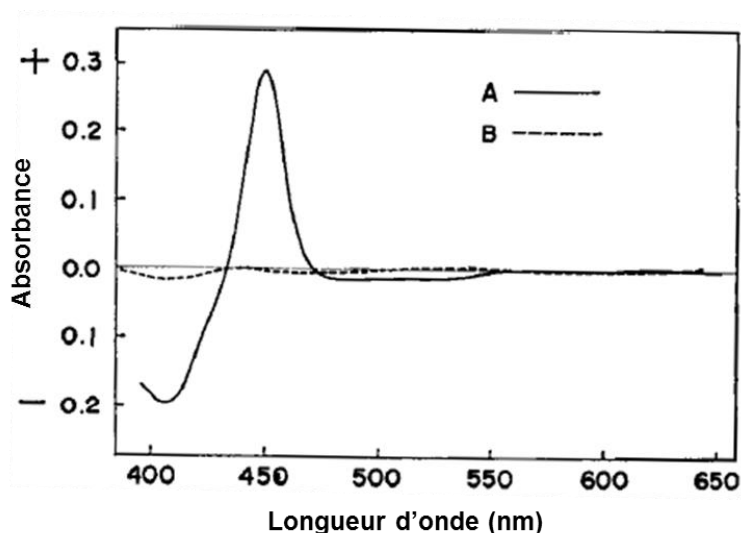


Figure (17) Spectre d'absorption à 450 nm des CYPs (Omura and Sato, 1964). A) forme réduite avec CO B) sans CO.

Cette méthode a été adaptée à la microplaque ce qui réduit le temps de manipulation et limite la variation d'estimation entre les échantillons (Choi *et al.*, 2003).

La méthode de CO dose la totalité des CYPs (holoprotéine) présentes dans un échantillon biologique ou la quantité totale d'un CYP recombinant ou purifié. De plus, elle permet, en cas d'un CYP recombinant ou purifié, la vérification de l'intégrité de l'enzyme (holoprotéine) pour les études d'activité puisqu'une absence d'activité serait associée avec une absence d'absorption à 450 nm avec un shift à 420 nm qui représente une forme dégradée instable de CYP (Omura and Sato, 1964b).

2.8.1.2 Quantification des CYPs par des méthodes immunologiques

Le WB a été utilisé pour doser les CYPs pour la première fois par Guengerich *et al.* (Guengerich *et al.*, 1982) et est devenu dès lors la méthode la plus utilisée pour quantifier les CYPs dans des différents types d'échantillons.

Le WB a été largement utilisé afin de quantifier des CYPs dans des microsomes de foie e.g. (Shimada *et al.*, 1994) et de l'intestin humain e.g. (Paine, 2006) (Figures 18 et 19).

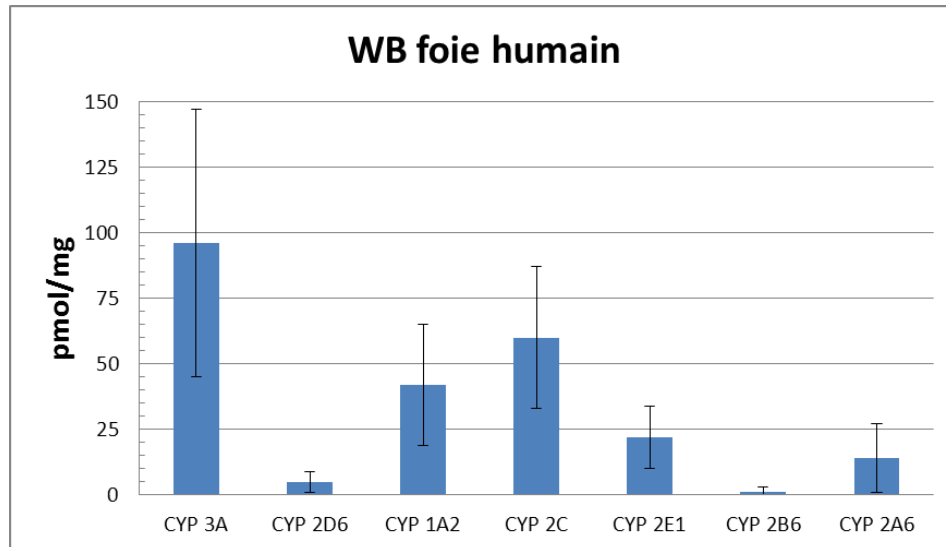


Figure (18) Quantification des CYPs dans 60 foies humains (30 japonais + 30 caucasiens) par WB.

Des CYPs recombinants purifiés ont été utilisés comme standards. La moyenne de 60 échantillons avec l'écart-type sont représentés. D'après (Shimada *et al.*, 1994).

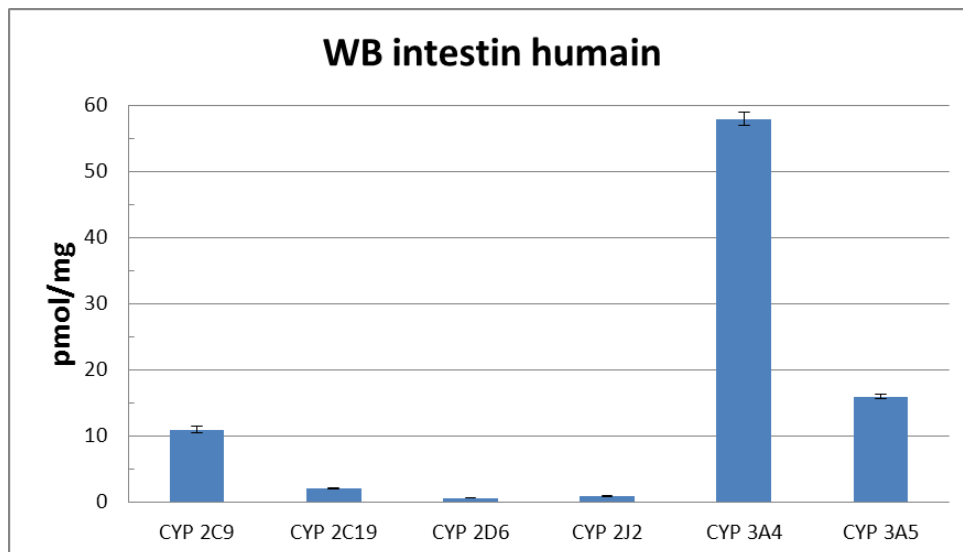


Figure (19) Quantification des CYPs dans un mélange de microsomes d'intestin humain (31 échantillons sauf pour CYP3A5 : 11 échantillons) par WB.

Des CYPs recombinants exprimés dans des lymphoblastes humains ou dans des baculovirus (CYP3A5) ont été utilisés comme standards. La moyenne de 3 analyses avec l'écart-type sont présentés. D'après (Paine, 2006).

Différentes équipes ont employé le WB afin de quantifier les CYPs dans les microsomes de foie humain (HMLs) (Guengerich and Turvy; 1991; Rodrigues, 1999; Tomonori *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002; Rowland Yeo *et al.*, 2004; Gaedigk *et al.*, 2006; Dennison *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2010).

La méthode ELISA a été développée afin de doser certains CYPs (2 isoforme chez le rat) (Paye *et al.*, 1984), et dans HLMs (CYP1A, 2B, 2C, 3A et 2E1) (Snawder and Lipscomb, 2000) et (CYP3A4 et 3A5) (Barter *et al.*, 2010).

La stabilité de CYP2A6 dans une culture de mini organe, un modèle de la muqueuse nasale humaine pour les études de génotoxicologie, a été suivie par immuno-fluorescence (Kleinsasser *et al.*, 2009). Les cultures cellulaires de 5 donneurs ont été fixées au formaldéhyde et les membranes cellulaires ont été perméabilisées par la saponine afin de faciliter la pénétration intracellulaire des anticorps et leur liaison au CYP2A6. L'intensité de fluorescence qui représente la concentration de 2A6 est mesurée pendant 11 jours de culture par cytométrie en flux.

La fiabilité des méthodes immunologiques dépend de la sélectivité de l'anticorps. La forte homologie de séquence entre les CYPs et surtout entre les membres de la même sous famille (3A, 2C par exemple) rend la production d'un anticorps spécifique particulièrement difficile. La sélectivité croisée, la gamme dynamique étroite, la saturation et la qualité des standards représentent les grandes limitations de ces méthodes. De plus, le WB est une technique semi-quantitative et assez laborieuse à mettre en œuvre. Les résultats de WB dépendent fortement de la qualité des standards utilisés (protéine purifiée ou protéine surexprimée dans des systèmes d'expression hétérologues) et de la méthode de détection.

2.8.1.3 Quantification des ARNm par RT-qPCR

La qPCR a été utilisée pour étudier l'expression des gènes des CYPs ; 30 CYPs dans 11 tissus humain (Nishimura *et al.*, 2003), 23 CYPs dans 22 tissus humain (Bièche *et al.*, 2007)

Récemment, l'expression des ARNm pour 40 CYPs dans 41 tissus humains a été étudiée (Preissner *et al.*, 2013).

Les informations obtenues sur l'expression d'ARNm ne sont pas suffisantes. En effet, il y a un grand nombre de données publiées montrant que la concordance entre l'expression d'ARNm et l'expression des protéines est assez médiocre, en particulier pour les protéines membranaires y compris les CYPs (Anderson and Seilhamer, 1997; Chen *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2004; Cox and Mann, 2007; Bièche *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2011).

2.8.1.4 Quantification des CYPs par spectrométrie de masse

Il existe des différences importantes dans nos connaissances sur les effets du sexe, de l'âge ou d'autres différences phénotypiques sur l'expression des isoenzymes des CYPs chez l'homme. La forte homologie de séquence entre les CYPs limite l'efficacité des méthodes d'immunologie et d'activités fonctionnelles. Les progrès dans le domaine de la spectrométrie de masse ont permis d'améliorer ces connaissances.

Une grande partie des méthodes de dosage des protéines par spectrométrie de masse a été utilisée pour quantifier les CYPs dans différents échantillons (ICAT, marquage chimique léger par des dérivés chlorés et bromés, iTRAQ, acétylation, LA-ICP-MS, ^{18}O , AQUA, PSAQ et sans marquage). Ces méthodes seront détaillées ci-dessous et discutées à la fin de chaque partie.

2.8.1.4.1 Marquage chimique

La méthode ICAT a été utilisée pour une quantification relative et absolue de 16 isoformes dans le micrososome de foie de souris traitée ou non par le phénobarbital (Jenkins *et al.*, 2006). Une deuxième génération d'ICAT comprenant un acide labile a été utilisée, ce qui permet d'éliminer la biotine après avoir purifié les peptides marqués afin de diminuer la taille des peptides. L'une des limites des méthodes qui utilise des étiquettes réagissant avec la cystéine, est parfois l'absence de signaux en MS de peptides protéotypiques contenant cet acide aminé. Par exemple, les auteurs n'ont pas trouvé de peptides protéotypiques contenant une cystéine pour différencier les membres de certaines familles comme 3A11/13/16 et les 2B9/10/13/20 chez la souris (Jenkins *et al.*, 2006).

Duan *et al.* ont développé une méthode de quantification absolue de 5 CYPs recombinants (Duan *et al.*, 2007) (3A4, 2D6, 2C9/19 et 2E1). Deux réactifs, le 2-bromo-4'-chloroacetophenone (p-CPB) et le 2-bromo-4'-bromacétophénone (p-BPB), qui réagissent spécifiquement avec le groupe sulfhydryle de la cystéine dans les peptides tryptiques. Les échantillons à quantifier et les gammes d'étalonnage sont alors marqués par p-CPB, tandis que des peptides standards marqués par p-BPB sont utilisés comme étalons internes. Le micrososome de foie de rat a été utilisé comme matrice afin de préparer les gammes d'étalonnage. Ces résultats ont été ensuite comparés avec l'ICAT, utilisée comme méthode de quantification absolue. Dans cette méthode d'ICAT, les peptides standards ont été marqués par le ^{12}C -ICAT afin de préparer les gammes d'étalonnage, tandis que les échantillons sont marqués par ^{13}C -ICAT. Des valeurs très proches ont été trouvées entre les deux méthodes. La méthode de marquage par p-CPB et p-BPB a montré une bonne linéarité entre 10 fmol/ μg et 5 pmol/ μg et une LOQ de 10 fmol/ μg avec un CV de 30% à la LOQ.

La méthode iTRAQ a aussi été utilisée pour quantifier relativement le 2A6 dans des échantillons de foie humain contrôles et atteints par un carcinome (Wang *et al.*, 2003). Le 2A6 est sous-exprimé dans les échantillons tumoraux.

Une autre méthode de marquage chimique a été utilisée pour suivre l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) dans le foie de rat (Jia *et al.*, 2007). Les résidus N-terminaux des peptides tryptiques ont été acétylés par le d0-anhydride acétique pour le contrôle et par le d6-anhydride acétique pour les échantillons traités, après avoir bloqué la chaîne amine latérale de la lysine par guanidinylation. 17 CYPs ont ainsi été identifiés et quantifiés dont les CYPs 2C11, 3A2 et 2E1 qui sont sous-exprimés, tandis que les 2C6, 2B2 et 2B1 sont surexprimés.

Les méthodes de marquage chimique permettent en général de réaliser une quantification relative. Les méthodes qui marquent la cystéine (ICAT, dérivés chlorés et bromés) ne sont pas l'approche idéale pour différencier et quantifier des protéines à haute homologie de séquence comme les CYPs (si le peptide protéotypique ne contient pas la cystéine). Les méthodes de marquage chimique nécessitent des étapes de préparation compliquées. Les réactions inattendues peuvent influencer la fiabilité de la quantification.

2.8.1.4.2 Marquage enzymatique

Le marquage enzymatique ^{18}O a été utilisé pour quantifier relativement 16 isoformes dans le microsome de foie de souris traité ou non par le 1,4-bis-2-(3,5-dichloropyridyloxybenzene) (Lane *et al.*, 2007). Les échantillons contrôles et traités ont été séparés sur un gel SDS-PAGE, digérés et marqués par ^{16}O (échantillons contrôles) ou ^{18}O (échantillons traités) puis analysés par nano-LC-MS/MS. La différence de masse est de 4 Da suite à l'incorporation de deux atomes d'oxygène en C-terminal. Cette méthode a permis de distinguer les CYPs 2B10 et 2B20. A l'exception de CYP2A12, 2D10 et 2F2, tous les CYPs quantifiés ont été affectés par le traitement. Les CYP1A2, 2A4/5, 2B10, 2B20, 2C29, 2C37, 2C38, 3A11 et 3A1 étaient surexprimés, tandis que les CYP2C40, 2E1, 3A41 et 27A1 étaient sous-exprimés.

La méthode du marquage enzymatique ^{18}O est une méthode de quantification relative. De plus, en cas d'incorporation incomplète de ^{18}O , l'interprétation du spectre devient difficile.

2.8.1.4.3 Couplage immunochimie-MS

Une méthode fondée sur le couplage laser LA-ICP-MS a été développée pour la semi-quantification des CYPs (1A1 et 2E1) dans les microsomes de rat traités par le 3-méthylcholanthrène ou par l'isoniazide et les microsomes de duodénum de cochons miniatures traités par un hydrocarbure aromatique polycyclique (Roos *et al.*, 2008). Les protéines de microsomes ont ainsi été séparées sur un gel SDS-PAGE et les deux CYPs ont été liés par des anticorps spécifiques couplés à l'euprium ou l'iodure afin d'être détectés par

LA-ICP-MS. Cette méthode remplace la détection chimioluminescente du WB et elle conduit à une sensibilité similaire. Elle permet de détecter et quantifier plusieurs protéines en une seule prise en utilisant un seul anticorps par protéine.

Un anticorps polyclonal anti-peptide protéotypique a aussi été développé pour identifier et quantifier les CYPs(1A2 et 2E1) humains recombinants par « peptide mass fingerprinting », PMF MALDI-TOF (Kornilayev and Alterman, 2008). Cette méthode est proche de SISCAPA mais l'IS utilisé n'est pas marqué (peptide protéotypique de CYP2B2 de rat).

Les méthodes du couplage immuno-MS sont limitées comme les méthodes immunologiques par la spécificité de l'anticorps pour différencier et quantifier des protéines à haute homologie de séquence comme les CYPs.

2.8.1.4.4 Sans marquage

Le nombre de peptides identifiés a été utilisé dans une approche sans marquage pour quantifier relativement 14 CYPs dans six échantillons de foie et de trois tumeurs provenant de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (Lane *et al.*, 2004).

L'approche sans marquage a aussi été utilisée pour distinguer et quantifier relativement deux polymorphismes du CYP2D6 (2D6.1 et 2D6.22, purifiés et supersomes) en utilisant des peptides protéotypiques contenant l'acide aminé correspondant au SNP pour l'identification ainsi que l'intensité des ions (EIC) pour la quantification (Yu *et al.*, 2009).

Une quantification relative de 18 CYPs (foie humain) a été réalisée en utilisant la méthode emPAI (Seibert *et al.*, 2009).

Les méthodes sans marquage sont simples et peu coûteuses mais la précision de l'analyse est limitée en raison de l'absence de peptides de référence pour la quantification (Zhang *et al.*, 2011). De plus, ces méthodes ne donnent qu'une quantification relative.

Alterman *et al.* ont utilisé l'approche PMF MALDI-TOF, pour quantifier 2 CYPs dans le foie de rat à haute homologie de séquence de CYPs(2B1 et 2B2), et 3 CYPs humain recombinants purifiés de CYPs(1A2, 2C19 et 2E1) en utilisant un peptide protéotypique de CYP2B2 comme étalon interne universel (Alterman *et al.*, 2005). La quantification absolue a été réalisée en préparant des gammes d'étalonnage contenant des peptides standards et l'étalon interne dans une matrice simple (BSA). Cette méthode n'a pas été validée dans une matrice complexe comme les HLMs. La linéarité de la gamme est comprise entre 0,5 et 70 pmol.

2.8.1.4.5 Dilution par des isotopes stables

La méthode AQUA-MRM a été utilisée par plusieurs équipes pour quantifier les CYPs dans les microsomes humain. Le tableau (4) représente les différents CYPs quantifiés.

Tableau (4) Les méthodes AQUA-MRM réalisées pour quantifier les CYPs chez l'homme.

Méthode	Type échantillon	Technique	CYP (pmol/mg)
AQUA (Wang <i>et al.</i> , 2008)	Baculosomes, pool foie humain	UPLC-TQ SRM	3A (6-257), 3A4 (9-322), 3A5 (0,2-34)
AQUA (Langenfeld <i>et al.</i> , 2009)	30 foies humains	1D-SDS-PAGE, LC-QTRAP MRM	2D6 (0 à 80)
AQUA (Wang <i>et al.</i> , 2006)	1 foie humain (femme)	1D-SDS-PAGE, LC-MRM	2E1 (100)
AQUA (Seibert <i>et al.</i> , 2009)	7 foies humains	Gel, nanoLC-QTRAP SRM	2E1 (88-200), 1A2 (165-263)

Une approche hors gel (gel-free) a été développée pour quantifier la sous famille 3A dans le microsome de foie humain en utilisant des peptides protéotypiques marqués (^{15}N , ^{13}C) de 3A, 3A4 et 3A5 (Wang *et al.*, 2008). Les gammes d'étalonnage ont été préparées avec une série de dilution des 3A4 et 3A5 recombinants (baculosomes). Une quantité connue des peptides standards marqués est ajoutée comme étalon interne. Le ratio entre peptide non marqué et peptide marqué a été utilisée pour la quantification en TQ-SRM. Les quantités des CYPs contenues les baculosomes, utilisées pour préparer les gammes, sont mesurées par un spectrophotomètre (holoprotéine). Les quantités de protéines injectées variaient entre les gammes et les échantillons. La linéarité de la gamme linéaire était comprise entre 0,02 et 15 pmol. LOQ= 8 fmol/ μg , CV% $\leq 27\%$. Une seule transition a été suivie par peptide ce qui est une limitation à la sélectivité de la transition choisie.

Le CYP2D6 a été quantifié dans 30 HLMS avec la méthode AQUA-MRM (en gel) (Langenfeld *et al.*, 2009). Les peptides standards ont été ajoutés dans le gel avant la digestion. La gamme de linéarité était comprise entre 250 et 1000 fmol ajoutés dans 15 μg microsomes de foie (de métaboliseurs lents). Trois transitions ont été suivies par peptide.

Les CYPs 1A2 et 2E1 ont été quantifiés dans 3 et 4 HLMS, respectivement (Seibert *et al.*, 2009). Les peptides standards marqués ont été ajoutés dans le gel avant la digestion. Une seule transition a été suivie par peptide. La gamme dynamique de détection était entre 0,1 et 1,5 pmol injectés. Le ratio entre le peptide marqué et le peptide endogène a été utilisé pour déterminer la quantité des CYPs.

Le PSAQ-MRM a été utilisé pour quantifier le CYP11A1 mitochondrial dans la rétine et le cortex de glandes surrénales de bovin (Liao *et al.*, 2010).

La méthode PSAQ utilise la protéine elle-même comme un standard mais la production et la purification de la protéine sont laborieuses. Le dosage d'un grand nombre de CYPs avec cette

méthode est onéreuse et laborieuse puisque chaque protéine cible a besoin d'une protéine marquée.

La méthode AQUA MRM a montré une grande reproductibilité de l'analyse mais elle augmente de manière significative le coût et le temps d'optimisation de la méthode, ainsi que le temps d'analyse, surtout quand il y a un grand nombre d'analytes à étudier (Zhang *et al.*, 2011; Pailleux and Beaudry, 2012).

Il est important d'avoir une méthode de quantification des CYPs fiable, peu coûteuse et reproductible. Afin de réaliser cet objectif, nous avons essayé d'améliorer les méthodes déjà publiées. L'utilisation d'une matrice complexe similaire à celle des échantillons à analyser pour améliorer la méthode sans marquage a été utilisée par Alterman *et al.*. L'approche sans gel de Wang *et al.* est améliorée par l'utilisation de quantités connues des peptides standards pour préparer les gammes à la place des CYPs recombinant (baculosomes) (où la quantité exacte d'apoprotéine est inconnue). Nous avons aussi essayé de valider la méthode dans différentes matrices.

2.8.2 Evolution de l'état de l'art au cours de ces 3 dernières années

La quantification des CYPs, en particulier par spectrométrie de masse, est un domaine très évolutif et elle a continué à évoluer en parallèle avec ma thèse. Cet aspect sera discuté à la fin de la publication 1 (chapitre résultats 1.13.3)

3. Technologies LC-MS

L'identification et la quantification des protéines par spectrométrie de masse sont précédées en général par une étape séparative qui sert à introduire l'échantillon dans le spectromètre de masse tout en diminuant sa complexité. L'étape de séparation la plus répandue pour les études de protéomique est la chromatographie liquide grâce à sa facilité de couplage avec le spectromètre de masse. Les techniques de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse utilisées dans ce travail seront décrites

3.1 La chromatographie liquide (LC)

La chromatographie est une technique qui permet la séparation de plusieurs composés en mélange, en vue de leur caractérisation. Les composants à séparer sont répartis entre deux phases, l'une est fixe (phase stationnaire), tandis que l'autre (la phase mobile) se déplace dans un sens déterminé. Une phase mobile peut être un liquide, un gaz ou un fluide supercritique, tandis que la phase stationnaire peut être un solide, un gel ou un liquide.

En général, un système chromatographique comprend les éléments suivants :

Un système d'introduction de l'échantillon, une colonne analytique qui contient la phase stationnaire, une pompe permettant de débiter une phase mobile et un détecteur qui peut être de type UV, MS ou autre.

Une séparation chromatographique se produit si les composants d'un mélange interagissent à des degrés différents avec les phases mobiles et / ou stationnaire et donc mettent des temps différents pour se déplacer dans la colonne jusqu'au détecteur.

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été utilisée durant ma thèse et sera détaillée ci-dessous.

3.1.1 HPLC

Le couplage de l'HPLC au MS (surtout, le MS équipé d'une source ESI) est très répandu pour les études de protéomique qualitatives et quantitatives. La performance de l'HPLC a compensé l'étape de séparation des protéines sur un gel grâce à sa résolution séparative, sa reproductibilité, sa rapidité, la possibilité d'effectuer des étapes d'enrichissement des protéines à faible concentration complètement automatisées mais aussi d'injecter une très faible quantité de l'échantillon en mode nano-LC.

L'HPLC est constituée d'une phase stationnaire solide et d'une phase mobile liquide. Les composés, sont séparés grâce à leur interaction entre la phase stationnaire de la colonne chromatographique et la phase mobile.

Pour l'analyse des peptides, le système chromatographique le plus adapté est la séparation sur des colonnes à polarité de phase inversée. En chromatographie de phase inverse, la phase stationnaire est apolaire, de nature lipophile, à base de silice sur laquelle sont greffées des chaînes alkyles de C4 à C30. La séparation est effectuée par un gradient de phase mobile qui est un mélange de solvants polaires, tel l'eau, l'acétonitrile ou le méthanol. Le gradient se compose d'un solvant A (aqueux) et d'un solvant B (organique) dans des proportions déterminées au préalable. Les peptides sont séparés en fonction de leur polarité : du plus polaire au moins polaire grâce au gradient de phase organique.

Des tampons peuvent être ajoutés en faible quantité dans la phase mobile afin d'améliorer l'ionisation de l'analyte et / ou la séparation chromatographique. Des tampons acides (donneurs des protons) comme l'acide formique, le TFA et l'acétate, sont utilisés en cas de composés basiques (cas des peptides tryptiques) et le composé sera ionisé positivement. Des tampons basiques (accepteurs des protons) comme l'ammoniaque sont utilisés en cas de composés acides qui seront ionisés négativement.

Le TFA améliore la séparation chromatographique en HPLC-UV mais il n'est pas compatible avec l'ESI car il est responsable d'une suppression du signal dans la source.

L'utilisation de phases mobiles et stationnaires adaptées donne une bonne séparation des composés d'intérêt, qui permettra d'observer un pic isolé, fin et symétrique. Quand le détecteur est un spectromètre de masse, la surface du pic chromatographique est fonction de la concentration de la solution analysée en ce composé.

Toutes les études des CYPs ont été réalisées en utilisant une colonne C18 de phase inverse.

L'avantage de l'étape de séparation chromatographique est qu'elle diminue la complexité de l'échantillon à analyser et cela augmente la sensibilité de MS en diminuant la LOD et la LOQ. Un phénomène de suppression ionique en ESI peut être observé avec des matrices complexes, où des composés (interférents) (co-élus avec l'analyte) peuvent affecter l'ionisation en ESI en changeant l'efficacité de formation ou de désolvatation des gouttelettes et par conséquent affecter le nombre des ions formés en phase gazeuse (Annesley, 2003).

De plus, cette étape de séparation est automatisée augmentant considérablement le débit des analyses.

3.1.2 UPLC

Afin d'augmenter la performance de l'HPLC, une technologie appelée « Ultra Performance Liquid Chromatography » (UPLC) a été développée. L'UPLC utilise le même principe de l'HPLC en utilisant des colonnes plus courtes remplies de particules plus petites < 2 μm (tandis que les colonnes HPLC sont généralement remplies de particules de 3 à 5 μm) et des débits plus élevés ; par conséquent, une augmentation de la vitesse de l'analyse, une résolution et une sensibilité supérieures sont observées.

L'UPLC utilise une génération d'appareils de LC compatible avec les hautes pressions générées (500 à 1000 bar) contre 400 bar maximum en HPLC. En UPLC, le volume mort est moins important que dans l'HPLC, les pics chromatographiques sont plus fins et les temps d'analyse sont considérablement réduits.

3.1.3 Nano-LC

Dans le domaine biologique et surtout pour les études en protéomique, seules de petites quantités d'échantillon sont disponibles. Cela a conduit au développement de techniques adaptées aux petites quantités de matériels à analyser telle que la Nano-LC. En Nano-LC, de faibles débits sont utilisés (20 à 200 nL/min) et le système est couplé avec un MS équipé avec une source nanospray (nano-ESI). Les colonnes analytiques utilisées sont de petit diamètre (75 μm). L'échantillon est injecté sur une précolonne qui permet d'une part de débarrasser les sels qui peuvent gêner l'ionisation et d'autre part de concentrer l'analyte et augmenter la sensibilité au détriment du temps d'analyse.

3.2 Spectrométrie de masse

3.2.1 Présentation générale

Les caractéristiques de la spectrométrie de masse lui ont donné une position exceptionnelle parmi les méthodes analytiques : la sensibilité, la rapidité et la diversité de ses applications (Hoffmann and Stroobant, 2007).

Grace au progrès des techniques fondées sur la spectrométrie de masse, son utilisation continue de croître dans tous les domaines de la recherche (physique, chimie, biologie).

Dans le spectromètre de masse, les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge m/z , et sont détectés en proportion de leur abondance. Un spectre de masse d'une molécule ou d'un mélange complexe est donc produit. Le résultat est fourni sous la forme d'un graphique représentant l'abondance relative des ions (intensité) en fonction du rapport m/z .

Un MS contient toujours les éléments suivants, comme illustré dans la figure (1): introduction de l'échantillon à analyser, par exemple grâce à un chromatographe en phase gazeuse ou une

sonde d'insertion directe; une source d'ionisation pour produire des ions à partir de l'échantillon; un ou plusieurs analyseurs de masse pour séparer les différents ions selon leur rapport m/z , un détecteur pour "compter" les ions sortants du dernier analyseur en convertissant les ions en signaux électriques, et enfin un système de traitement de données qui produit le spectre de masse sous la forme appropriée.

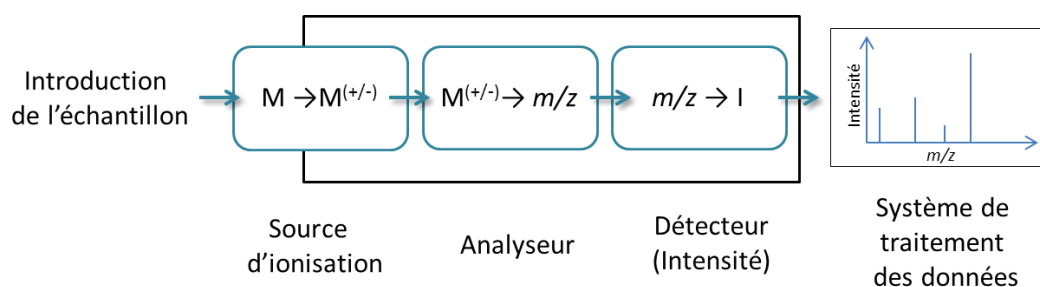


Figure (1) Représentation schématique d'un spectromètre de masse

3.2.2 Les sources d'ionisation

A la fin des années 80, des techniques qualifiées comme douces, adaptées à l'étude des biomolécules, ont été développées : La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) en 1987 puis l'ionisation par electrospray (ESI) en 1988.

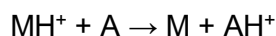
3.2.2.1 Source MALDI

Le MALDI est une technique d'ionisation douce introduite en 1987 suite aux travaux parallèles de deux équipes. L'équipe japonaise de Tanaka (Tanaka *et al.*, 1987, 1988) ainsi que Karas et Hillenkamp (Karas and Hillenkamp, 1988; Karas *et al.*, 1987). Le développement du MALDI a permis à Tanaka de partager le prix de Nobel de chimie en 2002.

Deux étapes sont distinguées dans le MALDI. L'échantillon à analyser est mélangé dans la première étape à une grande quantité de matrice. Ce mélange échantillon/matrice est déposé ensuite sur une plaque métallique où il va co-cristaliser. La matrice utilisée pour le MALDI est généralement composée d'une petite molécule organique capable d'absorber des longueurs d'ondes UV/IR (e.g. acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique pour l'analyse des peptides et des petites protéines, acide sinapinique pour l'étude des protéines). La matrice sert d'un côté à protéger l'analyte en absorbant la grande partie de l'énergie du laser et d'un autre côté à transférer la charge vers l'analyte.

La plaque MALDI est mise sous vide et un tir du laser ($\lambda=335$ nm pour un laser grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (Nd:YAG)) va frapper l'échantillon. Suite à cette irradiation, la

matrice absorbe à la longueur du laser et s'ionise après excitation électronique et thermique, puis un transfert d'un proton aura lieu entre la matrice et l'analyte (Knochenmuss and Zenobi, 2003).



Le mécanisme exact d'ionisation en MALDI n'est pas complètement élucidé.

Ainsi des ions monochargés et protonés sont majoritairement formés par spectrométrie de masse MALDI. Le MALDI est devenue l'une des méthodes d'ionisation de choix qui permet l'analyse de molécule de hauts poids moléculaires comme les polymères synthétiques et les biopolymères (peptides, protéine, oligonucléotides..) (Pasch and Schrepp, 2003).

L'ionisation MALDI donne des ions en forme de paquets pulsés, donc elle est généralement couplée à un analyseur à temps de vol.

3.2.2.2 Electrospray (ESI)

Le couplage electrospray ou électronébulisation (ESI) / spectrométrie de masse a été développé par Fenn (Fenn *et al.*, 1989) ce qui lui vaudra de partager avec K. Tanaka et K. Wüthrich le prix de Nobel en chimie en 2002.

L'ESI est une technique d'ionisation douce par laquelle des ions sont produits, à pression atmosphérique, en faisant passer un liquide à travers un capillaire métallique maintenu à haute tension (typiquement 3-4 kV pour la production d'ions positifs ; légèrement inférieure, et de polarité opposée, pour la production d'ions négatifs). L'electrospray est un processus électrochimique dans laquelle, la haute tension, produite par une différence de potentiel entre le capillaire et la contre électrode, va créer des charges dans le liquide à la pointe du capillaire par oxydation (cas des ions positifs). Le liquide chargé va se déformer, sous l'effet de la haute tension, en formant un cône dit « cône de Taylor » où un brouillard de gouttelettes chargées sera formé (Figure 2).

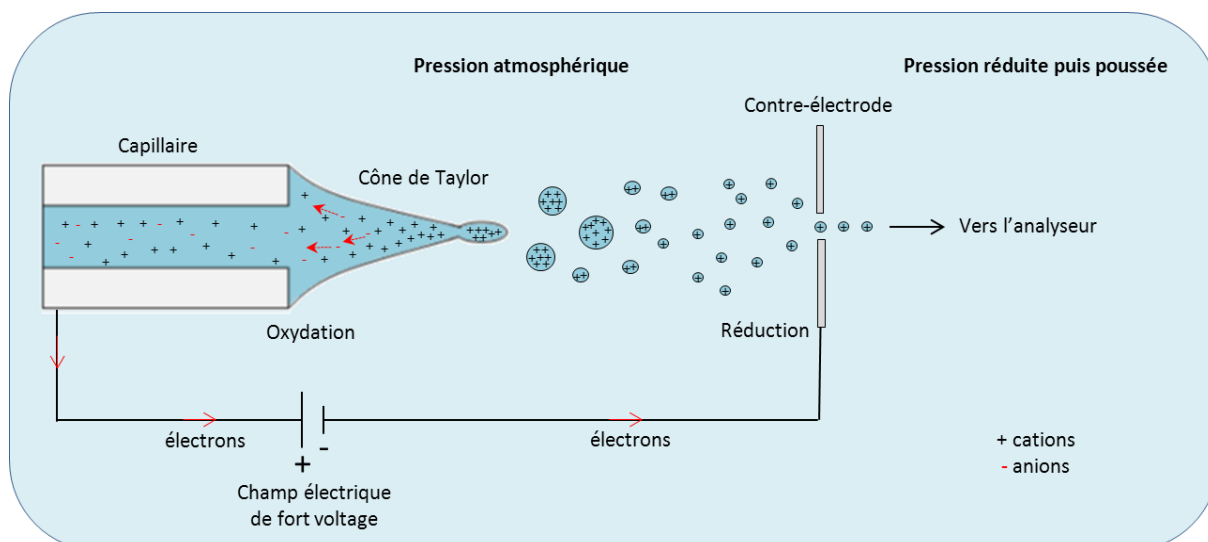


Figure (2) Représentation schématique du principe d'ionisation par electrospray (mode d'ionisation positif)

Ces gouttelettes subissent lors de leur passage dans la source une désolvatation progressive par un flux d'azote chauffé. Cela entraînant une diminution de la taille des gouttelettes et par conséquent l'augmentation de la densité de charge au sein de la gouttelette. Au moment où les forces de répulsions coulombiennes deviennent supérieures à la tension de surface de la gouttelette (limite de Rayleigh), celle-ci va exploser en gouttelettes plus petites. Ce phénomène sera répété pour plusieurs générations de gouttelettes de plus en plus petites jusqu'à avoir enfin des ions totalement désolvatés en phase gazeuse. Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer ce phénomène :

- Modèle de Dole (la charge résiduelle) (Dole *et al.*, 1968) propose que les explosions coulombiennes se poursuivent jusqu'à élimination complète du solvant afin d'aboutir à un ion totalement désolvaté en phase gazeuse. Ce modèle expliquerait le processus de production de macromolécules chargés en phase gazeuse.
- Modèle d'Iribarne et de Thomson (évaporation ionique) (Iribarne and Thomson, 1976) propose que la taille des gouttelettes sera suffisamment faible après une série d'explosions coulombiennes afin d'émettre directement les ions en phase gazeuse par désorption de champ. Ce modèle s'appliquerait quant à lui aux petites molécules.

L'ESI a été développée initialement pour l'analyse des protéines mais son utilisation s'est rapidement étendue à l'analyse de petites molécules. En outre, l'ESI permet de générer des composés multi-protonés $[M+zH]^{z+}$ qui sont observables quand l'ion monochargé dépasse le domaine de masse de l'analyseur.

Quand un faible débit est utilisé (de l'ordre de 20 à 200 nL/min) la source est appelée « nanoelectrospray » ou nano-ESI. Cette technique consiste à coupler la sortie de colonne

analytique avec une aiguille émettrice conductrice. L'orifice de sortie de l'aiguille présente un diamètre de 1 à 2 μm . Une différence de potentiel d'environ 1,5 kV est appliquée entre l'aiguille, et l'orifice d'entrée du spectromètre de masse. Ce champ électrique intense ainsi créé produit un spray et la désolvatation des ions présents. Le processus de formation des ions est principalement le même que dans l'ESI "classique". L'avantage de la technique nano-ESI est sa facilité de couplage à un système de chromatographie liquide (de type Nano-LC) qui augmente la sensibilité de l'analyse et diminue la quantité d'échantillon injectée.

3.2.3 Les analyseurs

Après avoir été produit en source, les ions sont ensuite transmis et focalisés par un système optique vers l'analyseur de masse où ils seront séparés en fonction de leur rapport m/z .

Il existe plusieurs types d'analyseurs, Seuls ceux utilisés durant ma thèse seront décrits.

3.2.3.1 Quadripôle

Le principe de l'analyseur quadripolaire a été décrit pour la première fois par Paul et Steinwedel en 1953 (Paul and Steinwedel, 1953). Cet analyseur sépare les ions en fonction de leur m/z en utilisant la stabilité des trajectoires dans un champ électrique. Il est constitué de quatre barres parallèles métalliques de section hyperbolique disposées en vis-à-vis, deux à deux (Figure 5).

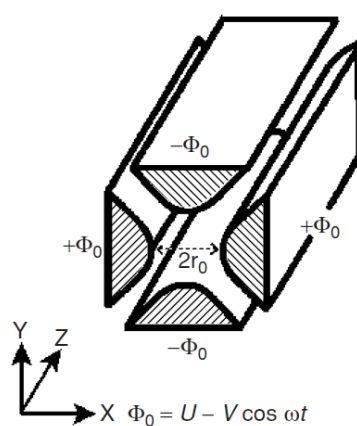


Figure (5) Schéma d'un quadripôle (Hoffmann and Stroobant, 2007).

Un champ quadripolaire est le résultat de l'application de deux potentiels :

Un potentiel ($\Phi_0 = U - V \cos \omega t$) est appliqué sur les deux barres diamétralement opposées tandis qu'un potentiel opposé ($-\Phi_0 = -U + V \cos \omega t$) est appliqué sur l'autre paire.

U est une tension continue, V l'amplitude de la tension radiofréquence et ω représente la fréquence angulaire.

Les ions entrant dans le quadripôle prennent une trajectoire de type sinusoïdale sous l'influence de ce champ. La trajectoire des ions dépend d'une part des valeurs de ces tensions et d'autre part du leur rapport m/z selon les équations différentielles de Mathieu :

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad \text{Avec } u = x \text{ ou } y ; \quad \xi = \frac{\omega t}{2} ; \quad a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2} ; \quad q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2}$$

a_u et q_u sont les solutions de l'équation différentielle

m est la masse de l'ion

ze est la charge électronique de l'ion

r_0 est le rayon du cercle inscrit entre les 4 barres

ω est la fréquence de la composante angulaire

U est la valeur de composante continue

V est l'amplitude de la composante radiofréquence

r_0 et ω sont constantes tandis que U et V sont variables. Donc pour un m/z particulier, a ne dépend que de U et q ne dépend que de V.

Deux types de solutions sont distingués : Les trajectoires stables avec des valeurs U et V qui permettent aux ions d'un m/z donné de traverser le quadripôle pour atteindre le détecteur et les trajectoires instables où les ions ayant des m/z différents percutent alors l'une des barres ou sortent du quadripôle.

Chaque rapport m/z a un diagramme de stabilité qui lui est propre. Ce diagramme peut être représenté en fonction des valeurs U et V (Figure 6).

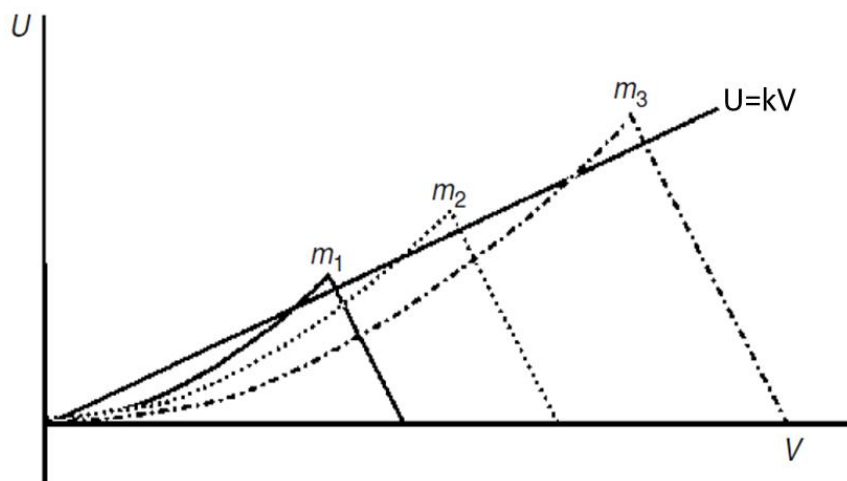


Figure (6) Diagramme de stabilité des ions en fonction des valeurs U et V pour des valeurs de masse différente ($m_1 < m_2 < m_3$).

Pour un balayage maintenant le rapport U/V constant, la droite traverse les différents diagrammes de stabilité des ions et permet leur transmission successive. C'est le mode « scan »

La résolution en masse est proportionnelle à la valeur de la pente k de cette droite de balayage. Plus k est élevé, plus la résolution est importante et plus l'intensité de signal est faible. A l'inverse, un k faible conduit à une faible résolution mais à une grande sensibilité.

Quand U est nulle, tous les ions sont transmis et le mode est appelé « *RF only* ». Dans ce mode, le quadripôle peut être utilisé comme un guide d'ion ou une cellule de collision quadripolaire.

Le quadripôle fonctionne aussi dans un mode dit « SIM » dans lequel les valeurs U et V restent constantes et un seul rapport m/z est transmis. Dans ce mode très utilisé pour la quantification, le quadripôle travaille comme un filtre de masse.

La gamme de masse accessible pour un quadripôle va jusqu'à m/z 4000.

3.2.3.2 Triple quadripôle

Le triple quadripôle (QqQ) ou (TQ) comprend deux analyseurs quadripolaires (Q1 et Q3) séparés par un quadripôle q fonctionnant en mode « *RF only* » qui sert de cellule de collision si besoin après avoir été rempli par un gaz inerte comme l'argon (Figure 7).

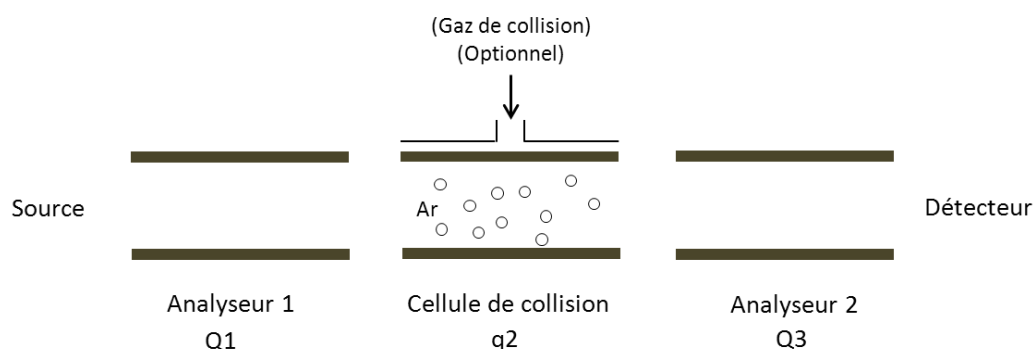


Figure (7) Schéma d'un triple quadripôle.

Le TSQantage EMR de chez Thermo Scientific utilisé pour la quantification des CYPs a été programmé en mode SRM (*Single/Selected Reaction Monitoring*) ou MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) dans lequel le premier quadripôle Q1 marche comme un filtre de masse afin de sélectionner un m/z , l'ion sélectionné est fragmenté dans la cellule de collision q2 puis un fragment (SRM) ou plus (MRM) sont sélectionnés dans le troisième quadripôle Q3 qui marche comme un filtre de masse aussi. Ce mode d'analyse permet de quantifier des composés avec une très grande sensibilité (minimiser le bruit de fond en augmentant la sélectivité). Ce spectromètre a une gamme de m/z de 10 à 3000 et une résolution de 0,7 à 0,1.

Le TQ permet aussi d'effectuer des analyses dans différents modes comme les modes de recherche de précurseurs (PIS : Precursor Ion Scan) ou de perte de neutres (NLS : Neutral Loss Scan).

3.2.3.3 Analyseur à temps de vol

L'analyseur à temps de vol (TOF : Time of Flight) a été décrit pour la première fois par Wiley et McLaren en 1955 (Wiley and McLaren, 1955). C'est un analyseur séparant les ions en fonction de leur temps d'arrivée au niveau du détecteur.

Le principe du TOF est simple (Figure 8). Les ions sont accélérés par une différence de potentiel V appliqué à la sortie de la source d'ions.

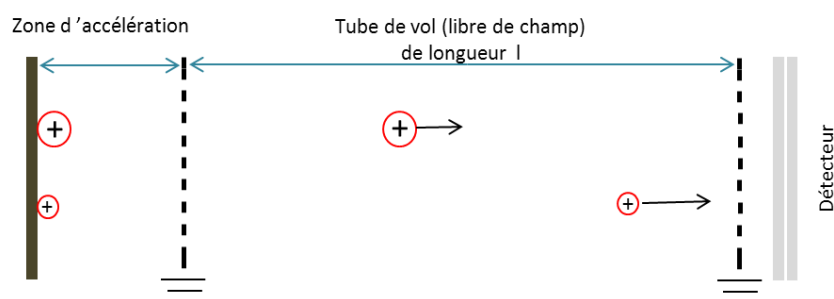


Figure (8) Schéma de principe d'un analyseur TOF en mode linéaire.

Tous les ions reçoivent la même énergie cinétique E_c qui est proportionnelle à leur masse selon la relation :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = zeV$$

Les ions sont alors introduits dans un tube de vol, sous vide poussé et libre de tous champs électrique ou magnétique, jusqu'à leur arrivée au détecteur (en mode linéaire). En mesurant le temps d'arrivée des ions au détecteur t , la valeur m/z peut être facilement calculée :

$$t = \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \times l$$

où l est la longueur du tube de vol, m la masse de l'ion, e la charge élémentaire et z son nombre de charge.

Les ions ainsi accélérés volent d'autant plus vite qu'ils sont légers.

La résolution en masse R de TOF en mode linéaire est donnée par l'équation.

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Afin d'améliorer la performance du TOF un système de miroir électrostatique (reflectron) a été développé et placé en sortie du tube de vol (Figure 9). Le reflectron a pour avantage d'améliorer la résolution en refocalisant en temps les ions ayant le même rapport m/z mais de vitesse initiale différente et en augmentant le temps de vol.

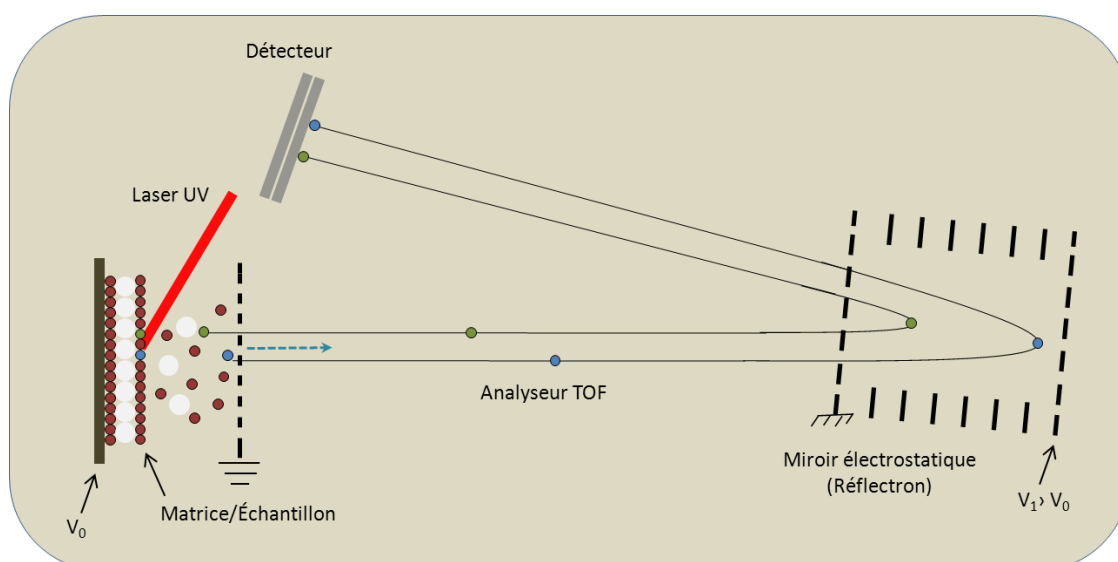


Figure (9) Schéma général de fonctionnement d'un MS MALDI-TOF.

Le laser volatilise et ionise les échantillons qui sont introduits par suite dans le tube de vol, passant par le système de miroir électrostatique « reflectron » et arrivant au détecteur.

3.2.3.4 L'hybride Q-TOF

Le TOF est couplé avec les sources pulsées comme le MALDI. Le couplage avec des sources continues comme l'ESI est devenu possible en développant l'injection orthogonale (figure 10). Un modulateur est mis en place avant l'entrée du tube de vol afin de stocker puis d'injecter de façon pulsée les ions dans le TOF. C'est le cas du Qq-TOF qui est un instrument hybride composé de deux analyseurs, un quadripôle couplé orthogonalement à un TOF. Les ions sont sélectionnés dans le premier quadripôle et puis fragmentés dans le deuxième quadripôle q transformé en chambre de collision. Ensuite, les ions fragments sont refocalisé en paquet et injectés orthogonalement dans le TOF.

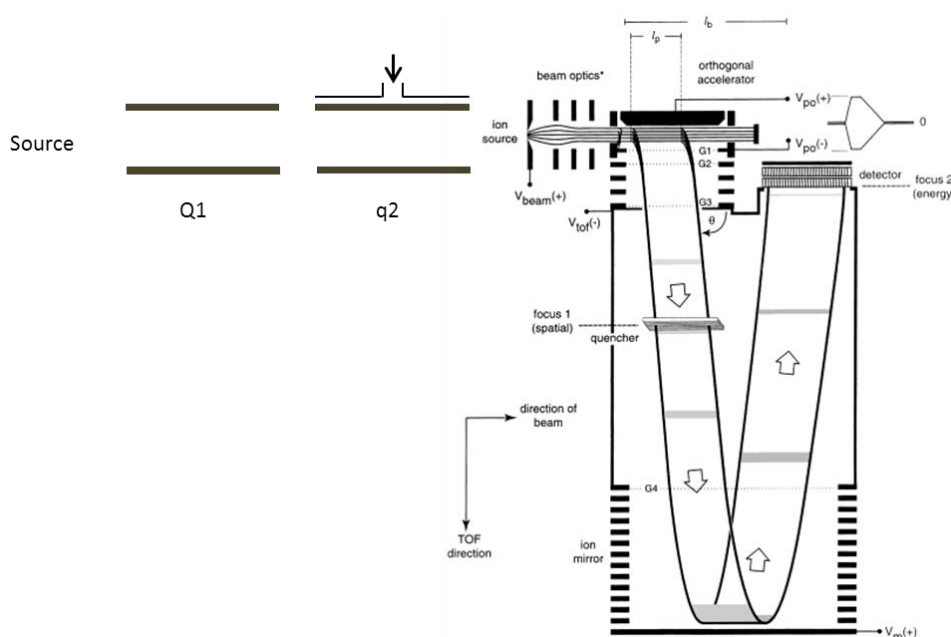


Figure (10) schéma de principe de Q-TOF avec un analyseur TOF à injection orthogonale. D'après (Guilhaus *et al.*, 2000).

3.2.3.5 L'analyseur TOF-TOF

Un appareil de type TOF-TOF se compose d'un TOF couplé à une chambre de collision à haute énergie de collision (1 ou 2 keV dans notre cas) puis un deuxième TOF équipé d'un reflectron. Les ions sont sélectionnés dans le premier TOF, fragmentés dans la chambre de collision et les fragments sont analysés dans le deuxième TOF. Cet appareil permet l'analyse en mode MS/MS.

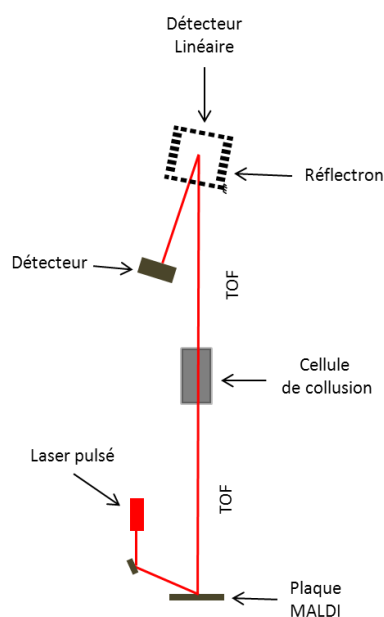


Figure (11) schéma de principe de MALDI-TOF/TOF (4800 AB Sciex)

3.2.3.6 Piège linéaire (trappe linéaire)

Le piège linéaire est constitué de quatre barres d'un quadripôle fermé par deux plaques de piégeage d'entrée et de sortie qui assurent le confinement des ions de façon axiale à l'intérieur du quadripôle, en appliquant une tension continue positive pour piéger les ions positifs et de polarité inverse pour les ions négatifs. Ce type d'analyseur permet d'éjecter les ions de deux façons : radiale ou axiale (Figure 12). Quand la trappe linéaire est couplée avec un orbitrap comme dans l'appareil hybride de thermo Fischer LTQ-Orbitrap, l'éjection des ions, détectés à basse résolution dans la trappe, de façon radiale permet leur détection par un double détecteur situé sur deux des côtés du piège linéaire. L'éjection axiale permet d'envoyer les ions vers un autre analyseur, comme l'orbitrap, afin d'effectuer une analyse en hautes résolution et précision en masse.

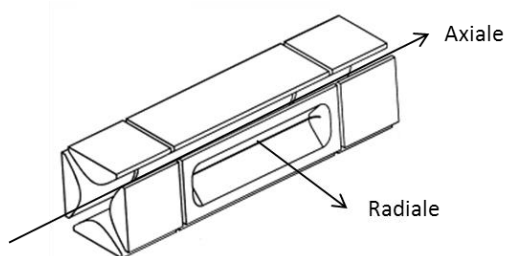


Figure (12) Schéma d'une trappe linéaire. D'après (Hoffmann and Stroobant, 2007)

- Un piège à ions permet : 1) de piéger des ions ; 2) de mesurer la masse des ions accumulés ; 3) d'isoler un ion ; 4) de fragmenter un ion.

- Pour réaliser un spectre MS, les étapes 1 et 2 sont enchaînées et pour un spectre MS/MS, l'ordre des étapes correspond à 1, 3, 4 et 2. Les pièges permettent de reproduire plusieurs fois les étapes 3 et 4. Cette propriété permet de réaliser des expériences MS^n , c'est-à-dire de réaliser des MS/MS de MS/MS de MS/MS (n fois).

3.2.3.7 L'orbitrap

L'analyseur Orbitrap a été développé à la fin des années 90 par A. Makarov (Makarov, 2000). Il est composé d'une électrode externe en forme d'olive coupée en deux parties égales séparées par un espace étroit et d'une électrode interne coaxiale en forme de fuseau. Les ions sont injectés tangentiuellement, par l'espace séparant les deux moitiés de l'électrode externe, dans le champ électrique existant entre les électrodes et sont piégés car leur attraction électrostatique vers l'électrode interne est contrebalancée par la force centrifuge. Ainsi, les ions adoptent des trajectoires circulaires autour de l'électrode interne et simultanément se mettent à osciller suivant l'axe z (Figure13).

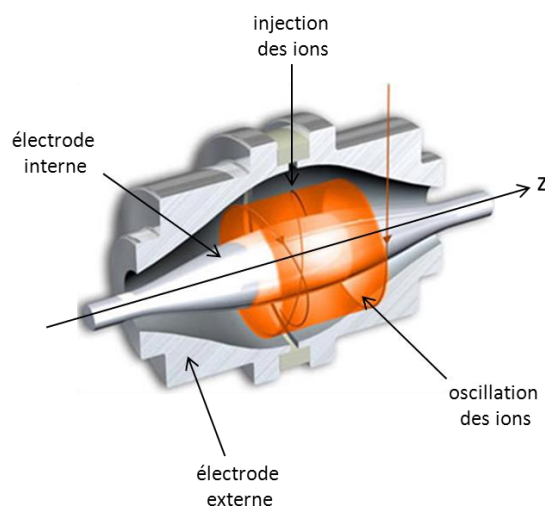


Figure (13) Schéma de l'Orbitrap (Thermo Scientific).

Les oscillations axiales des ions se font à une fréquence ω ne dépendant que du rapport m/z et sont indépendantes de l'énergie cinétique des ions. $\omega = \sqrt{\left(\frac{z}{m}\right)k}$

La détection fait appel à la charge, à la masse et à la fréquence d'oscillation latérale des ions.

La détection dans l'Orbitrap se fait par mesure du courant induit par le déplacement latéral des ions et transformation de Fourier du signal. La résolution de l'orbitrap dépend du temps de piégeage et peut atteindre plusieurs centaines de milliers.

3.2.4 Le détecteur

Après avoir traversé l'analyseur, les ions sont détectés par un système capable de transformer un signal ionique en un signal électrique mesurable. Cette détection dépend de la masse, de la charge et de la vitesse des ions détectés.

Le détecteur du TSQ vantage, utilisé pour la quantification des CYPs dans ce travail, sera détaillé ci-dessous.

Le détecteur du TSQ comprend principalement deux parties : la dynode de conversion et l'électromultiplicateur (Figure 14).

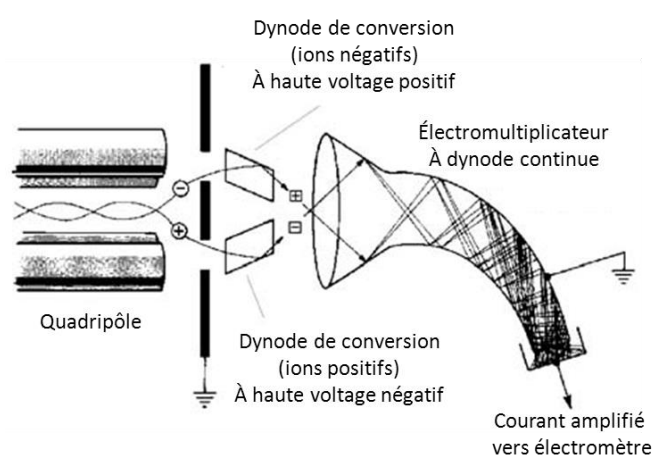


Figure (14) Schéma de détecteur du TSQ. Adapté de (Hoffmann and Stroobant, 2007).

À l'entrée du détecteur, deux dynodes de conversion sont situées à angle droit du faisceau ionique. Chaque dynode est constituée d'une surface métallique, portée à un potentiel de 15kV pour les ions négatifs, à -15kV pour les ions positifs. Quand un ion arrive sur la dynode de conversion, des particules secondaires de polarité opposée (négatives en cas d'ions positifs et positives en cas d'ions négatifs) sont produites. Les particules secondaires d'intérêts sont donc des électrons et des ions négatifs produits par les ions positifs au niveau de la dynode et des ions positifs en cas des ions négatifs.

Les particules secondaires produites sont ensuite accélérées vers l'électromultiplicateur.

L'électromultiplicateur à dynode continue est composé de tube en verre dopé au plomb en forme de corne. Un gradient de potentiel est appliqué tout au long de ce tube afin de former une cathode à l'entrée et une anode à la sortie. Arrivant de la dynode de conversion, les particules secondaires accélérées frappent la surface interne de la cathode provoquant l'éjection des électrons. Ces électrons sont accélérés par le champ à l'intérieur du tube et

frappent de nouveau la paroi interne du tube provoquant encore l'émission d'un grand nombre d'électrons secondaires. Ainsi une cascade d'électrons est créée donnant au niveau de l'anode un courant mesurable, proportionnel à la quantité de particules secondaires arrivées à la cathode. L'amplification du courant par l'électromultiplicateur peut atteindre 10^6 à 10^7 .

3.3 Modes d'acquisition en spectrométrie de masse utilisés pour la quantification des protéines

Plusieurs modes d'acquisitions sont utilisés pour la quantification des protéines (Figure 15) :

3.3.1 Le mode 'Data Dependant Acquisition' (DDA)

Dans ce mode, utilisé pour l'identification et quantification des peptides, une première acquisition dite « survey scan » va permettre de dresser l'inventaire des ions présents à un instant donné afin de programmer la sélection et la fragmentation des 2 à 20 ions multichargés les plus abondants (les peptides tryptiques conduisent généralement à la formation d'ions doublement ou triplement chargés), après ce processus un nouveau « survey scan » est effectué et le cycle est répété tout au long de l'analyse. Ce mode est utilisé pour la quantification relative (sans marquage et marquage avec des tags) et il est moins adapté pour les protéines de faibles abondances. La quantification se fait par extraction et l'intégration des signaux des précurseurs fragmentés (EIC). Les spectromètres de masse permettent, de plus, de paramétrer un nombre de fragmentation maximum par peptide et d'exclure ces peptides de la liste des peptides à fragmenter le temps d'un pic chromatographique. Cette exclusion évite ainsi de fragmenter systématiquement les peptides les plus intenses et permet de descendre plus profondément dans le protéome étudié.

3.3.2 Le mode ciblé (SRM, selected reaction monitoring)

Ce mode d'acquisition permet de réaliser une détection sélective et une quantification ciblée d'une protéine dans un mélange complexe. Il consiste à sélectionner l'ion précurseur du peptide d'intérêt, le fragmenter et ensuite sélectionner un ou plusieurs ions fragments spécifiques. Le MS de type triple-quadrupôle est généralement utilisé pour ce mode d'acquisition où les premier et troisième quadrupôles servent de filtres tandis que le deuxième est utilisé comme cellule de collision. La cible à quantifier doit être connue. Pour cela, une analyse MS-MS/MS est effectuée afin de déterminer les trois paramètres indispensables pour le mode SRM : ion précurseur (peptide), énergie de collision, la masse du fragment unique à mesurer. Quand plus d'un fragment est suivi le mode est appelé MRM (multiple reaction monitoring). Ce mode est utilisé avec les méthodes de quantification absolue AQUA et il est le plus adapté pour les protéines de faible abondance (Picotti and Aebersold, 2012).

3.3.3 Le mode MRM cube (MRM³)

Un développement de la technique MRM est appelé MRM³ et consiste à re-fragmenter un fragment spécifique obtenu en mode MRM afin d'améliorer la sensibilité et la sélectivité de la méthode en diminuant le rapport signal/bruit. Ce mode est réalisé grâce à un instrument hybride de type piège à ion (QTRAP) (Fortin *et al.*, 2009; Lakowski *et al.*, 2013).

3.3.4 Le mode de fragmentation parallèle (MS^E)

Ce mode utilise une analyse 'Data Independent Acquisition' (DIA) dans laquelle aucune sélection d'ion n'est effectuée. Tous les ions détectés sont fragmentés sans sélection en alternant un mode d'énergie basse et un mode d'énergie haute (MS^E) en utilisant un MS haute résolution (Q-TOF). Les fragments sont liés à leurs précurseurs par le temps de rétention (Silva *et al.*, 2006). Ce mode génère les données les plus complètes qui peuvent être utilisées ensuite pour réaliser une analyse MRM (Niggeweg *et al.*, 2006). Ce mode est réalisé grâce à un type de MS hybride à haute résolution (Q-TOF) et utilisé pour la quantification sans marquage.

3.3.5 Le mode SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra)

C'est un mode d'acquisition développé récemment grâce au développement technologique en MS de type QTOF (TripleTOF, ABSciex) (Gillet *et al.*, 2012). Le SWATH permet l'analyse indépendante des données (DIA) avec des séries de fenêtres de m/z isolées et successives qui couvrent tout la gamme de m/z . Dans un premier temps, pour un cycle de 3.3 s, un « survey scan » (MS) de 100 ms est acquis. Ce scan est complété par 32 scans (MS/MS) de 100 ms chacun (une série de 32 fenêtres de 25 Th chacune pour balayer la gamme de 400 à 1200 Th). Ce mode combine la haute résolution, l'exactitude de masse, la rapidité d'acquisition et la sensibilité qui permettent d'identifier et de quantifier le protéome.

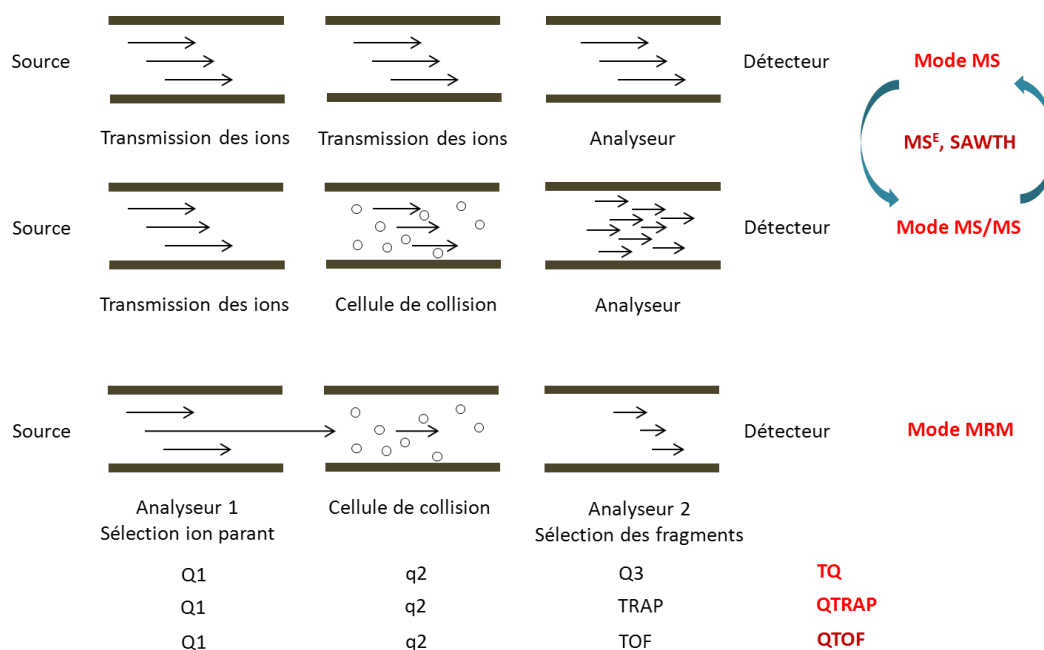


Figure (15) Modes d'acquisitions. Un MS hybride (spectromètre de masse en tandem) se compose de 3 parties : un analyseur quadripolaire Q1, une cellule de collision de type quadripolaire Q2, un analyseur Q3 de type quadripolaire (en cas de triple quadripôle TQ) qui peut être aussi une trappe (QTRAP) ou un tube de vol (QTOF).

3.3.6 Le mode PRM (Parallel reaction Monitoring)

C'est un mode d'acquisition introduit récemment, en utilisant un MS hybride à haute résolution (Q-Orbitrap ou QTOF). En PRM, les ions d'intérêt sont sélectionnés dans le quadripôle puis fragmentés dans la cellule de collision (HCD) et tous les fragments sont détectés à haute résolution. La sélection de masse exacte des fragments en utilisant un analyseur haute résolution permet d'augmenter la sélectivité en diminuant les interférents et par conséquent augmenter la sensibilité (Peterson *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013) (Figure 16).

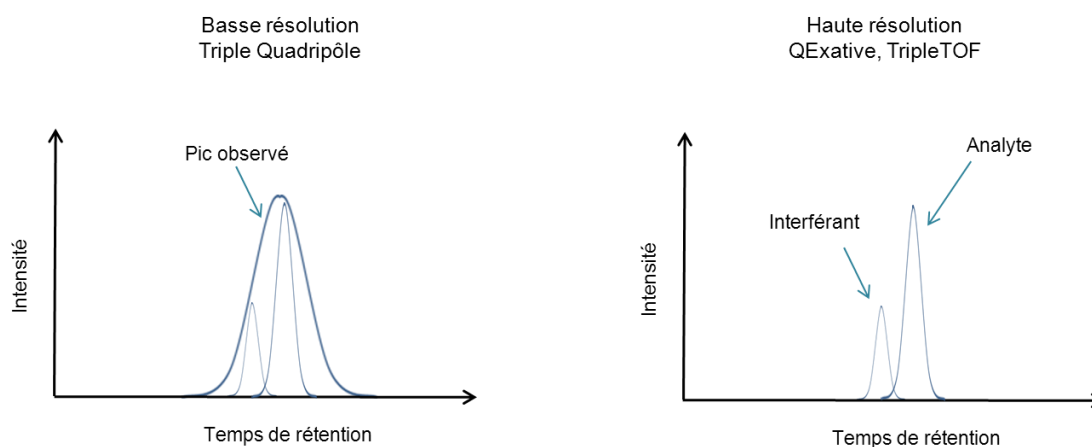


Figure (16) La performance de l'analyseur à haute résolution en termes de sélectivité et de sensibilité.

II. But du travail

Dans le cadre du besoin d'un dosage de CYPs fiable et sensible pour des applications pharmacotoxicologiques, ce travail a pour un but de

1. mettre au point une méthode de quantification par spectrométrie de masse de CYPs humains
2. appliquer cette méthode principalement au foie mais aussi dans d'autres tissus et dans différents systèmes d'expression hétérologues.

Le fait d'avoir des informations précises sur la quantité en protéine de chacun de ces CYPs nous permettra de mieux comprendre leur rôle pharmacologique, toxicologique (métabolisme des médicaments et des xénobiotiques, toxicité, pharmaco- et toxico-génétique) et/ou physiopathologique.

La première partie du travail a consisté à identifier et valider les peptides protéotypiques pour 6 isoformes de CYPs humains. Dans un deuxième temps, le dosage de ces 6 isoformes (CYPs 3A4, 3A5, 1A2, 2D6, 2C9 et 2J2) par spectrométrie de masse en couplage chromatographique a été mise au point et validé dans des systèmes d'expression recombinants (baculosomes et lignées cellulaires hépatiques HepG2).

La deuxième partie a consisté à doser spécifiquement ces 6 isoformes dans des microsomes et des mitochondries humaines afin de corrélérer ces données avec la séquence d'ADN, la quantité d'ARN et les activités enzymatiques spécifiques pour la relation génotype-phénotype.

III. Matériels et Méthodes

1. Réactifs chimiques et biologiques

Les solvants utilisés sont l'acétonitrile (ACN) de qualité ultra pure LC-MS (Backer, Interchim, Montluçon, France). L'acide formique (AF), l'acide trifluoroacétique (TFA), le dihydrogénocarbonate d'ammonium, l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA), l'acide sinapinique, l'iodoacétamide (IAA), le dithiotreitol (DTT), le cholate de sodium, la cystéine, le dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), le NADPH, la testostérone, la trypsine « trypsin type IX-S from porcine pancreas » sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). La trypsine « sequence grade » est fournie par Promega (Charbonnières-les bains, France).

Les flacons en verre et les inserts de 150 μL sont achetés chez Waters (Guyancourt, France).

Les peptides standards proviennent de chez GenScript USA Inc (Piscataway Township, USA).

Les réactifs pour la préparation des fractions de foie proviennent de chez VWR (Strasbourg, France).

Les réactifs pour la culture cellulaire proviennent de chez Fisher Scientific (Illkirch, France).

2. Baculosomes

Les CYPs humains recombinants (CYPs1A2, 2D6, 2C9, 3A4, 3A5) ont été exprimés dans des cellules d'insectes (infectées avec des baculovirus) et les fractions microsomales (baculosomes ou supersomes) ont été utilisées pour la mise au point de la technique. Les divers baculosomes sont commercialisés par la société Gentest, B.D. Biosciences. (Le Pont de Claix, France).

3. Les lignées cellulaires hépatiques HepG2

Les lignées HepG2 (ATCC[®] HB-8065[™]) (Molsheim, France) ont été cultivées dans notre laboratoire et un système d'infection par lentivirus a été mis au point afin d'avoir une expression stable de chaque CYP.

La lignée de cellules hépatiques HepG2 a été cultivée dans du milieu essentiel minimum contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et complété avec de la pénicilline (200 UI/mL), de streptomycine (50 $\mu\text{g/mL}$), de L-glutamine (0,3 mg/mL), de sodium pyruvate (1 mM), et de fungizone (0,5 $\mu\text{g/mL}$).

3.1 Adénovirus recombinants (Ad)

Les ADNc de CYP1A2 et CYP2J2 ont été clonés dans notre laboratoire, séquencés et ensuite envoyés à l'hôpital de l'Université de Nantes soutenue par *l'Association Française contre les Myopathies*. Les adénovirus utilisés sont de sérotype 5, incapables de se répliquer et dont les régions E1 et E3 sont délétées. La délétion de E1 rend le virus incapable de produire des particules virales dans les cellules cibles ; la région E3 code pour des protéines impliquées

dans l'échappement immunitaire du virus au système de défense de la cellule cible (He *et al.*, 1998). La préparation adénovirale est caractérisée par le titre de particule infectieuse par mL 3×10^{10} pi/mL (2J2) et $1,7 \times 10^{11}$ pi/mL (1A2).

Infection et biotransformation d'adénovirus : les cellules HepG2 ont étéensemencées à 10^6 cellules/boit (T-25). Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été incubées 4 h avec les adénovirus (5 à 15 MOI (multiplicity of infection) (nombre de particule virale par cellule), de Ad-2J2 et 25 à 150 MOI pour Ad-1A2) dans un milieu de culture cellulaire contenant 2% de FBS. Après 4 heures, le milieu contenant Ad- a été retiré et remplacé par du milieu de HepG2 normal.

3.2 Lentivirus recombinants (LV)

Les ADNc de CYP1A2, 2C9, 2D6, 2J2, 3A4 and 3A5 humain ont été clonés dans notre laboratoire, inséré dans un vecteur pHAGE-PGK-MCS-IRES-GFP et séquencés. Les plasmides ont été envoyés au Viral Vector et Gene Transfer Platform, (Université Paris Descartes, Hôpital Necker de Paris, France) pour produire un lentivirus recombinant HIV-1 Δ U3 SIN (non réplicatif) avec G glycoprotéine gène de Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) comme un « pseudotyping » enveloppe.

Infection lentivirale : les cellules HepG2 ont été infectées avec des particules lentivirales à une MOI de 20. Les cellules infectées ont été triées par FACS (Fluorescence-activated cell sorting) pour isoler des cellules exprimant des niveaux élevés de GFP (green fluorescent protein).

Les cellules HepG2 infectées avec un adénovirus ou un lentivirus ont été trypsinées, soniquées et les fractions microsomales (Mic_HepG2) ont été préparées comme décrit ci-dessous pour les microsomes de foie humain (HLMs).

Pour la préparation des homogénats totaux (HT_HepG2) des cellules HepG2, celles-ci sont lysées et homogénéisées à 4°C dans un Potter contenant du tampon hypertonique. Les HT_HepG2 et Mic_HepG2 ont été conservés à -80°C avant analyse.

4. Microsomes de foies humains

Les échantillons de foies humains conservés à -80°C ont été fournis par KaLy-Cell (Plobsheim, France). Ils ont été collectés en agrément avec les lois éthiques et les règlements en vigueur. Les informations sur les échantillons sont présentées dans tableau (S1, projet de publication 2).

Les fractions microsomales, mitochondriales et S9 sont préparées à 4°C par centrifugation et ultracentrifugation différentielle (Figure 1) selon la méthode décrite par Kremers *et al.* (Kremers *et al.*, 1981) avec quelque modifications mineures.

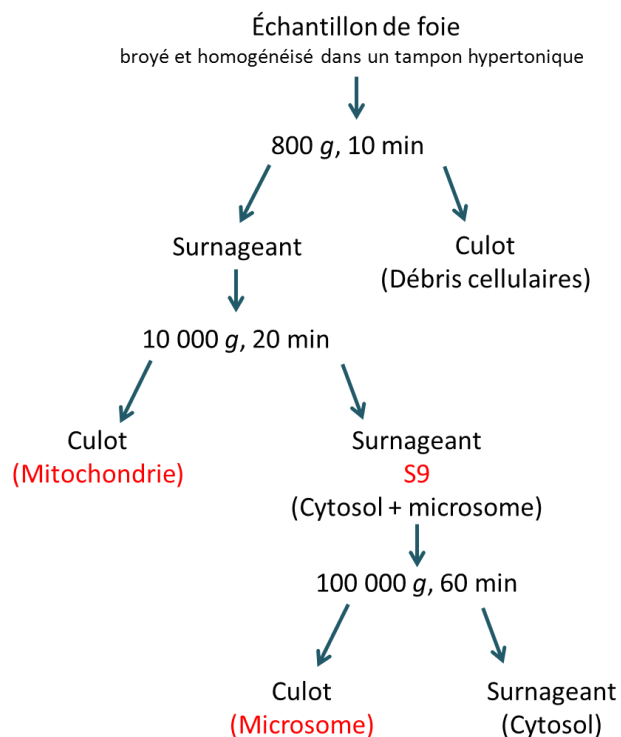


Figure (1) schéma explicatif des étapes de préparation des différentes fractions de foie.

Le tampon hypertonique utilisé est (0,25M sucrose, 10mM Tris /HCl, EDTA 1 mM, pH 7,4).

Les culots contenant les microsomes ou les mitochondries ont été resuspendus dans un tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 7,4) pour l'analyse par MS et en présence de glycérol (20%, v/v) et d'inhibiteurs de protéase (100 X), pour les autres analyses (activité enzymatique et WB). Tous les échantillons sont enfin conservés à -80°C avant analyse.

Le dosage de protéines totales dans les échantillons a été fait en utilisant la méthode d'acide bicinchoninique (BCA protein assay kit) de Pierce-Thermo Scientific (Illkirch, France). Une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) de 0,2 à 1 µg/µL est préparée. La concentration en protéines est ensuite déterminée au spectrophotomètre à 562 nm.

5. Western Blot

Les échantillons (de 5 à 20 µg/puits de protéines microsomaux) ont été dénaturés 3 min à 100°C dans du tampon Laemmli (glycérol 60 %, Tris 2 M pH 6,8, SDS 10 %) (Laemmli, 1970), soumis à électrophorèse sur un gel de SDS-PAGE 10%, et transférés sur membrane de transfert Hybond-C (GE Healthcare, Vélizy, France). La membrane est ensuite bloquée dans du tampon de phosphate contenant 0,1% de Tween 20 et 0,2% I-Block (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Des dilutions d'anticorps primaires (1/10000 sauf pour CYP3A5 1/5000) ont ensuite été appliquées pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés sont faits à façon chez le lapin et reconnaissent toute la protéine (Belloc *et al.*, 1996). Un deuxième

anticorps conjugué avec un enzyme (HRP) (Applied Biosystems), est appliqué (1/10000) et visualisé en utilisant un substrat chimioluminescent (ECL, GE Healthcare, Vélizy, France).

Une charge-coupled device (CCD) camera (ImageQuant LAS 4000) (GE Healthcare) est utilisée afin de réaliser la quantification. L'intégration des bandes est réalisée à l'aide du logiciel (ImageQuant TL 8.1) (GE Healthcare). Les gammes d'étalonnage et la quantité de protéine pour chaque CYP sont présentées dans le tableau (1).

Tableau (1) Quantités de protéine et le domaine dynamique pour WB.

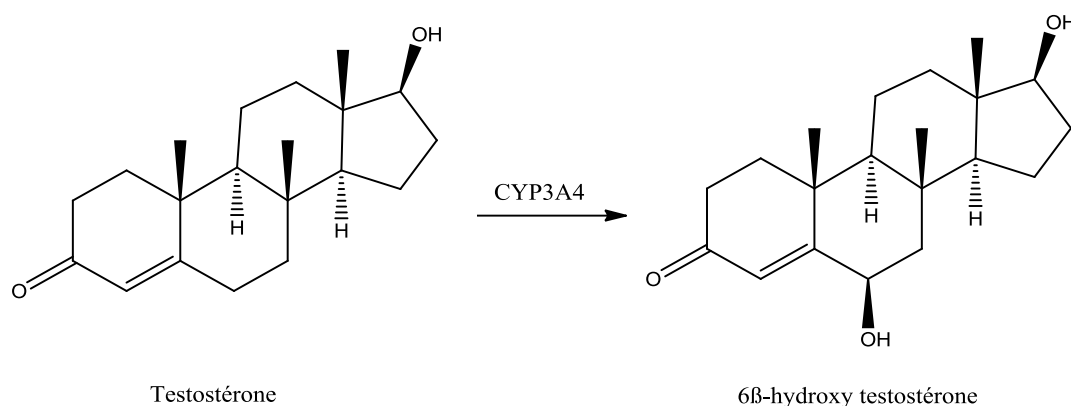
CYP	Quantité de protéine microsomale µg/puits	Domaine dynamique pmol/puits
1A2	10	0,05 à 0,5
3A4	5	0,05 à 0,5
3A5	10	0,1 à 0,5
2D6	20	0,025 à 0,5
2C9	10	0,1 à 2
2J2	20	0,025 à 0,5

6. Activités enzymatiques

Les activités Glo pour les CYPs 1A2, 3A4 et 2C9 ont été mesurées en utilisant le kit P450-Glo™ Assays (Promega, Charbonnières-les bains, France) selon le protocole fourni par le fournisseur.

Une plaque de 96 puits est utilisée. 5 µg de protéine de microsome de foie (en duplicat + un témoin sans NADPH) est combinée avec un substrat approprié (luciferin-1A2, luciferin-H et luciferin-IPA pour CYPs1A2, 2C9 et 3A4, respectivement) dans un tampon de phosphate de potassium (KPO₄). La réaction est initiée par l'ajout du système NADPH et une incubation à 37°C est réalisée.

La luciférine produite par les CYPs est détectée en ajoutant le réactif (Luciferin Detection Reagent). Ce réactif va simultanément arrêter la réaction enzymatique et initier un signal luminescent proportionnel à la quantité de produit formé par le CYP. Un luminomètre (EnVision de PerKinElmer) a été utilisé pour quantifier le signal.

L'activité testostérone pour le CYP3A4 (6 β -hydroxy testostérone)

La solution mère de testostérone est préparée à 10 mM dans le méthanol. Une solution de travail à 500 μM est préparée en diluant la solution mère dans un tampon de phosphate 100 mM à pH 7,4.

Pour chaque échantillon, un triplicat et un contrôle ont été préparés. 10 μL (25 μg de protéine microsomale) ont été mélangés avec 190 μL de tampon phosphate (pH 7,4 100 mM), 50 μL de solution A (26,1 mM NADP^+ , 66 mM de glucose 6-P, 66 mM MgCl_2 dans de l'eau) et 20 μL de solution B (40 U/mL glucose-6-P déshydrogénase dans tampon phosphate pH 7,4). Le contrôle a été mélangé avec 260 μL de tampon phosphate (sans les solutions A et B). La réaction a été initiée avec 30 μL de la testostérone (500 μM) ajoutés dans chaque tube (triplicat et témoin), et incubé à 37 ° C pendant 30 min.

L'incubation est arrêtée par l'ajout de 500 μL d'acétonitrile. Une étape de centrifugation est effectuée à 10000 g pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et congelé à -80°C en attendant l'analyse LC-MS.

Au jour d'analyse, le surnageant a été décongelé et dilué au $\frac{1}{2}$ soit 250 μL surnageant + 15 μL IS (2,3,4- $^{13}\text{C}_3$ -testostérone à 3,43 μM dans le méthanol) + 235 μL acétonitrile. Ce mélange est ensuite évaporé au speed-vac et reconstitué dans 100 μL de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (3/2). 5 μL ont été injectés.

Des gammes d'étalonnages (entre 1 et 6 μM) pour la testostérone et (entre 50 et 800 nM) pour la 6 β -hydroxy testostérone ont été préparées dans un volume final de 500 μL d'acétonitrile dopé par 102,9 nM d'IS. Les gammes ont été évaporées et reconstituées comme les échantillons.

7. RT-qPCR

Extraction des ARN totaux

Les ARN des biopsies de foies humains sont extraits à l'aide du Kit RNeasy Qiagen (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant.

Les ARN sont ensuite dosés par spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific) à 260 nm et conservés à -80°C.

La qualité des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% à l'aide d'un bioanalyseur (bioanalyseur 2100, Agilent technologies, Les Ulis, France).

Transcription inverse (RT)

Une réaction de transcriptase inverse (RT) est réalisée pour obtenir les ADN complémentaires (ADNc) des ARN. Les ARN sont rétrotranscrits à l'aide du kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Chaque échantillon (environ 500 ng d'ARN) est mélangé avec le mix de transcriptase inverse (2,5 µL tampon, 1 µL dNTP, 2,5 µL primers, 1,25 µL enzyme RT, 5,25 µL H₂O (RNase free)) et incubé 2 h à 37°C.

Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C en attendant de réaliser la qPCR.

Amplification d'ADNc par qPCR

Afin de réaliser la qPCR, une plaque multipuits (384 puits) est utilisée. Chaque puits est constitué de 1 µL d'ADNc préalablement dilué au quart et 9 µL de mix PCR (5 µL SYBR Green, 0,2 µL amorce U (10 µM), 0,2 µL amorce L (10 µM), 3,6 µL H₂O). Chaque échantillon est dosé en triplicat.

Le SYBR Green (ABsolute QPCR ROX Mix, ABGene, Courtaboeuf, France) est un fluorophore qui peut se fixer sur l'ADN double brin et devient alors fluorescent. La fluorescence est directement proportionnelle au nombre de copies du brin d'ADNc amplifié. Les amorces utilisées (amorce U et amorce L, se fixent en amont et en aval du fragment d'ADN à amplifier, respectivement) sont spécifiques des gènes étudiés (Bièche *et al.*, 2007) et commercialisées par Biopredic International (Rennes, France).

Pour chaque échantillon, un gène de référence TBP (TATA binding protein) est mesuré pour contrôler les variations en quantité d'ARN, et un pool d'ADNc (réalisé en mélangeant 1 µL de tous les échantillons) est dosé sur chaque plaque pour prendre en compte une éventuelle variation entre-plaques.

Les plaques sont ensuite placées dans un appareil (TaqMan) (ABI PRISM 7900 HT, Applied Biosystems) qui combine un thermocycleur et un détecteur de fluorescence, permettant la

réalisation de la PCR en temps réel. Le logiciel SDS (Sequence Detector System) 2.3 est utilisé pour suivre la fluorescence émise. Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

- Préchauffage : 95°C, 15 minutes,
- 40 cycles de (95°C, 15 secondes puis 65°C, 1 minute) correspondant la dénaturation de l'ADN bicaténaire et la hybridation des amorces – élongation, respectivement.
- Une étape de dissociation permet de s'assurer de l'amplification d'un seul amplicon.

L'appareil donne les valeurs de cycle seuil (Ct), correspondant au nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence plus élevé que le bruit de fond, qui seront utilisés pour faire les calculs selon la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Pour chaque échantillon :

$\Delta Ct = \text{moyenne des Ct pour un CYP} - \text{moyenne des Ct du gène TBP}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ d'un échantillon} - \Delta Ct \text{ d'un pool}$

L'expression de chaque CYP dans chaque échantillon est exprimée en % de l'expression de ce CYP dans le pool grâce à la formule : $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100$

8. Méthode d'analyse LC-MS

8.1 Solutions-mères

Les peptides standards reçus en poudre sont pesés sur une balance de précision et remis en suspension dans un volume d'eau. Si le peptide est partiellement soluble dans l'eau, l'ajout d'un acide (si la charge du peptide est positive), d'une base (si la charge du peptide est négative), ou de solvant organique (si la charge du peptide est neutre) a été effectué (Tableau 2). Ensuite chaque solution est aliquotée, stockée dans un congélateur à - 80°C, pour éviter des cycles de congélation et décongélation successifs lors de chaque analyse. Chaque aliquot est utilisé une seule fois.

Tableau (2) Solubilisation des peptides standards.

	Peptide	Charge	Solvant utilisé
P1_2J2	VIGQGQQPSTAAR	+	H ₂ O + Acétique acide 10%
P3_1A2	IGSTPVLVLSR	+	H ₂ O + Acétique acide 10%
P13_3A5	LDTQGILLQPEKPIVLK	Neutre	H ₂ O + ACN 10%
P16_2D6	DIEVQGFR	+	H ₂ O
P17_3A4	EVTNFLR	Neutre	H ₂ O
P19_2C9	GIFPLAER	Neutre	H ₂ O

Les résidus acides (D, E) et le C-terminal ont une charge -1 tandis que les résidus basiques (K, R et H) et le N-terminal ont une charge +1. La charge d'un peptide est calculée comme la somme des charges des acides aminés.

8.2 Solutions de travail

Le jour de l'analyse, les solutions de travail sont préparées à partir des solutions-mères qui ont été stockées à -80°C. En effet, on effectue une dilution de manière à avoir la même concentration pour chaque solution-mère puis on rassemble une fraction de chacune de ces solutions dans un flacon (mélange à 10µM). En fonction des différentes concentrations déterminées préalablement pour la gamme de concentration, plusieurs dilutions dans eau/ACN (80/20, v/v) sont encore effectuées.

8.3 L'étalon interne

Le glu-fibrinopeptide (GF) (EGVNDNEEGFFSAR) est un peptide de masse moléculaire 1570,6 Da. Le GF présente plusieurs avantages :

- Il n'est pas synthétisé *in vivo* et peut donc servir d'étalon interne (IS) pour chaque analyse.
- Il est stable à -20°C.
- Il présente un très bon rendement d'ionisation en ESI.
- Son temps de rétention est encadré par ceux des peptides protéotypiques des CYPs.

La concentration utilisée (1000 fmol injectées) est choisie pour obtenir une intensité correspondante à une intensité de milieu de la gamme par rapport à celles des peptides protéotypiques des CYPs.

Le GF est stocké à une concentration de 1 mM à -20°C et une solution de travail de 0,5 µM est préparée au jour de l'analyse.

8.4 La digestion trypsique

a) Les échantillons

100 µg de protéine microsomale ou mitochondriale ont été mis en solution dans un tampon de NH_4HCO_3 50 mM afin d'obtenir le même volume et la même concentration pour tous les échantillons. Un volume égal de cholate de sodium 4% (soit entre 1 à 2% concentration finale) préparé dans NH_4HCO_3 50 mM est ajouté. Un volume de 10% (v/v) de dithiotréitol (DTT, 100 mM), qui est un réducteur de ponts disulfures, est ajouté. Le mélange est chauffé à 56°C pendant 30 minutes, puis l'iodoacétamide (IAA) 15 mM est ajouté afin de traiter les résidus SH des cystéines par « carbamidométhylation », ce qui évite la reformation des ponts disulfure. 300 mM de cystéine sont ajoutés afin de neutraliser l'excès d'iodoacétamide. L'incubation avec l'iodoacétamide ou la cystéine a été effectuée pendant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. La trypsine est finalement ajoutée avec un ratio 2/100 (enzyme/substrat) pendant 16h à 37°C. Le TFA 0,5% (v/v) est ajouté afin d'arrêter la réaction de digestion et d'éliminer le cholate de sodium qui devient insoluble dans un milieu acide. Les échantillons sont centrifugés 20 min. à 10000 g à 4°C. Le surnageant est transféré dans un autre tube et séché dans le Speed Vac et puis stocké à -80°C jusqu'au jour de l'analyse.

b) Les gammes d'étalonnage :

25 µg de protéine de matrice (microsome de lignée cellulaire HepG2) dans 10 µl de NH_4HCO_3 ont été traités de la même manière que les échantillons de foie. Les peptides standards sont ajoutés après l'ajout de cystéine de manière à injecter des quantités croissantes (12,5, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 fmol) dans un solvant eau/ACN (80/20, v/v). Le but de l'ajout des peptides standards avant la digestion est d'obtenir des gammes d'étalonnages les plus fidèles car elles sont réalisées dans les mêmes conditions que les échantillons biologiques.

Juste avant analyse par MS, 1 pmol de GF est ajoutée sur l'extrait sec avant re-dissolution dans 50 µl d'eau/ACN/AF (94/5/1, v/v/v) pour servir d'étalon interne, et suivre une éventuelle dérive de la chromatographie et de MS. Une deuxième centrifugation (20 min à 10000 g à 4°C) a été introduite afin d'éliminer toutes les particules insolubles qui peuvent gêner la séparation chromatographique et diminuer la vie de la colonne.

8.5 Paramètres LC-MS

8.5.1 Paramètres d'analyse pour la LC

8.5.1.1 UPLC (Accela)

La chaîne utilisée pour la quantification des CYPs est une chaîne UPLC (Accela, Thermo Scientific) qui se compose de 3 parties : pompe, injecteur automatique et un détecteur UV (Figure 2)

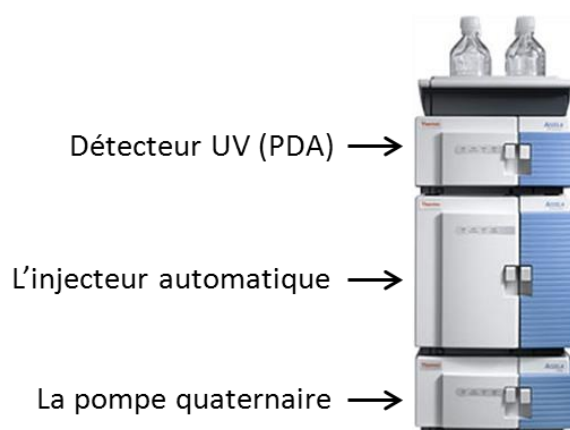


Figure (2) La chaine Accela

La pompe « Surveyor MS » est une pompe quaternaire équipée d'un système de dégazeur intégré et d'un amortisseur de pulsations. Elle fonctionne en gradient à des débits compris entre 25 et 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$.

L'injecteur automatique « Surveyor » permet d'injecter les échantillons avec une précision de 0.5% pour un volume injecté de 5 μL et plus. Son cycle d'injection est très court (30 secondes). De plus, cet injecteur est équipé d'une station de lavage pour nettoyer l'extérieur de l'aiguille afin de limiter les contaminations entre les échantillons (l'effet de mémoire « carry over »).

Cet injecteur possède 3 modes d'injections : « Full loop », « partial loop » et « no waste ».

Le mode d'injection utilisé dans ce travail est le mode « No waste » qui permet de minimiser le volume d'échantillon prélevé et économiser les échantillons. Volume prélevé = volume d'injection + 2 μL de solvant de nettoyage (volume d'échantillon perdu 0.25 μL).

La partie « injecteur automatique » contient un passeur d'échantillon, qui permet de contrôler la température des échantillons dans la gamme de 0 à 60 $^{\circ}\text{C}$, et un four à colonne qui permet contrôler la température de la colonne entre 5 et 95 $^{\circ}\text{C}$.

La sortie de la colonne est connectée directement au MS *via* la vanne de dérivation (divert valve) sans passer par le détecteur UV.

La colonne utilisée est une colonne ACQUITY UPLC BEH130 C18 de diamètre 2,1mm de longueur 100 mm et de diamètre de particules 1,7 μm . Une précolonne a été connectée avant la colonne pour la protéger.

Les paramètres ont été optimisés en mode FIA (Flow Injection Analysis) *via* une boucle d'injection de 5 μL : paramètres de source, énergies de collision pour chaque peptide standard pour obtenir les intensités de fragment optimum.

Au moment de l'analyse, la vanne de dérivation (divert valve) a été utilisée sans boucle pour évacuer les effluents indésirables (les premières 1,2 minute) et éviter de les introduire dans la source, améliorant ainsi la robustesse de l'analyse.

Le gradient a été optimisé pour avoir la meilleure séparation des différents peptides (Tableau 3)

Tableau (3) Le gradient optimisé pour la quantification des CYPs.

Temps (min)	A%	B%	Débit $\mu\text{L}/\text{min}$
0,00	95	5	350
9,00	44	56	350
10,00	2	98	350
12,00	2	98	350
12,20	95	5	350
16	95	5	350

Nous avons utilisé la même phase mobile qu'utilisée dans la littérature (Liao *et al.*, 2010; Kawakami *et al.*, 2011) :

A: H_2O + AF 0.1%, B: ACN + AF 0.1%

La colonne est chauffée à 40°C.

Pour l'analyse, des flacons en verre (Waters) et des inserts 150 μL (Waters) sont utilisés et la hauteur de l'aiguille d'injection a été réglée à 5 mm. 10 μL sont injectés.

La solution de nettoyage (eau/ACN/AF (89/10/1, v/v/v)) qui sert à rincer l'aiguille d'injection entre les analyses est sélectionnée pour qu'elle soit la plus proche du solvant de l'échantillon et pour diminuer l'effet de mémoire (« carry over »).

8.5.1.2 UPLC (Acquity)

La chaîne Acquity (Waters) est une chaîne UPLC à pompe binaire. Cette chaîne a été utilisée en couplage avec le Synapt G2 (Waters) lors de la réalisation de la comparaison de sensibilité et linéarité pour les peptides standards au début de ma thèse. Ce couplage a aussi été utilisé pour évaluer l'activité de CYP3A4 (6 β -hydroxy testostérone). La chaîne Acquity et le Synapt G2 sont pilotés par le logiciel Masslynx® (waters).

Le gradient utilisé sur les deux chaînes UPLC (Accela et Acquity) lors du test de comparaison est présentée dans le tableau (4)

Tableau (4) Le gradient et les paramètres utilisés sur (Accela et Acquity) lors du test de comparaison.

Temps (min)	A%	B%	Débit $\mu\text{L}/\text{min}$
0,00	100	0	500
5,00	30	70	500
6,00	2	98	500
7,00	2	98	500
7,10	100	0	500
9,00	100	0	500

A: H_2O + AF 0.1%, B: ACN + AF 0.1%, température de la colonne 40°C, volume injecté est 2 μl . Des flacons en verre (Waters) ont été utilisés et la hauteur de l'aiguille d'injection a été réglée à 1 mm.

Les paramètres de la chaîne Acquity lors de test d'activité 6 β -hydroxy testostérone sont présentés dans le tableau (5)

Tableau (5) Le gradient et les paramètres utilisés sur la chaîne Acquity lors du test d'activité.

Temps (min)	A%	B%	Débit $\mu\text{L}/\text{min}$
0,00	60	40	400
1,50	30	70	400
2,00	0	100	400
4,00	0	100	400
7,00	60	40	400

A: H_2O + AF 0.1%, B: ACN + AF 0.1%, température de la colonne 30°C, volume injecté est 2 μl . une colonne Acquity UPLC HSS T3 (2,1x100 mm, 1,8 μm) a été utilisé.

8.5.2 Paramètres d'analyse pour le MS

8.5.2.1 Paramètres du Synapt G2 et du TSQ Vantage lors du test de comparaison de la sensibilité et de la linéarité pour les peptides standards

Les peptides à quantifier sont des peptides tryptiques qui contiennent des acides aminés basiques (lysine ou arginine) donc le mode positif ESI+ a été choisi (Tableaux 6 et 7).

Tableau (6) Paramètres de source du Synapt G2.

Source Synapt G2	
Tension du capillaire	800 V
Température de source	120°C
Température de désolvatation	500°C
Débit de gaz de cone	20 L/h
Débit de gaz de désolvatation	600 L/h

Tableau (7) Paramètres de source du TSQ Vantage.

Source TSQ Vantage	
Tension du spray	3500 V
Température de vaporisation	400°C
Pression de sheath gaz	8 psi
Pression d'ion sweep gaz	0 psi
Pression de gaz auxiliaire	20 psi
Température du capillaire	300°C
Position de la sonde	1; C; 0

8.5.2.2 Paramètres du TSQ Vantage utilisés pour la quantification.

Pour obtenir une bonne détection sur le MS de l'ensemble de nos peptides, les paramètres de source ont été optimisés (Tableau 8).

Tableau (8) Paramètres de source du TSQ Vantage utilisés pour la quantification.

Source	
Tension du spray	3500 V
Température de vaporisation	250°C
Pression de sheath gaz	45 psi
Pression d'ion sweep gaz	4 psi
Pression de gaz auxiliaire	20 psi
Température du capillaire	300°C
Position de la sonde	1; C; 0

La méthode instrumentale MRM optimisée pour chaque peptide est finalement présentée dans le tableau (9).

Tableau (9) les paramètres d'acquisition pour chaque peptide.

	Peptide	m/z précurseur	Type de fragment	m/z fragment	Temps de scan (ms)	Energie de collision (eV)
P1_2J2	VIGQGQPSTAAR	$[M+2H]^{2+}$ 656,91	y_6^+	602,38	50	25
			y_7^+	730,44	50	23
			y_9^+	915,62	50	23
			y_{11}^+	1100,7	50	22
P17_3A4	EVTNFLR	$[M+2H]^{2+}$ 439,74	y_1^+	175,16	14	13
			y_3^+	435,28	14	14
			y_4^+	549,38	14	15
			y_5^+	650,3	14	15
P19_2C9	GIFPLAER	$[M+2H]^{2+}$ 451,7	F^+	120,26	14	22
			y_3^+	375,2	14	20
			y_4^+	488,3	14	20
			y_5^+	585,36	14	13
P16_2D6	DIEVQGFR	$[M+2H]^{2+}$ 482,23	a_2^+	201,1	14	17
			y_4^+	507,3	14	14
			y_5^+	606,38	14	15
			y_6^+	735,3	14	13
P3_1A2	IGSTPVLVLSR	$[M+2H]^{2+}$ 571,41	y_7^+	783,62	14	21
			y_5^+	587,43	14	22
			y_4^+	474,3	14	22
			y_7^{2+}	392,32	14	20
P13_3A5	LDTQGILLQPEKPIVLK	$[M+2H]^{3+}$ 598,1	y_{15}^{2+}	840,4	14	17
			y_{12}^{2+}	668,18	14	16
			y_{14}^{2+}	782,8	14	17
			y_8^+	923,6	14	23
GF	EGVNDNEEGFFSAR	$[M+2H]^{2+}$ 785,91	y_3^+	333,18	14	24
			y_4^+	480,26	14	21
			$y_{12}-NH_3^{2+}$	684,48	14	25
			y_7^+	813,5	14	27

Résolution Q1, Q3=0,7, Largeur de scan=1Da, pression de gaz de collision est 2 Pa, L'analyse a été effectuée en deux segments en fonction de temps de rétention de chaque peptide et le temps de scan, dépendant de nombre de transition dans le segment, a été sélectionné afin d'avoir au moins 12 points qui définissent le pic chromatographique.

8.5.2.2.1 Le système de traitement

Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific) est le logiciel de pilotage de l'ensemble de l'instrument analytique (chaîne de chromatographie et spectromètre de masse) et assure aussi le traitement automatique des données. Les paramètres utilisés pour l'intégration automatique des pics chromatographiques sont dans le tableau (10).

Tableau (10) Paramètres optimisés pour l'intégration automatique des pics chromatographiques.

		Minimum	Maximum	Valeur appliquée
Peak integration	Smoothing points	1	15	7
	Baseline window	20	100	90
	Area noise factor	2	20	5
	Peak noise factor	5	40	5
Constrain peak width	Peak height (%)	0	50	5
	Tailing factor	1,0	9,0	5
Minimum peak height (S/N)				10

8.5.2.2.2 Détermination de LOQ, LOD et de la présence d'un analyte dans les échantillons biologiques

Trois critères ont été appliqués afin de déterminer la LOQ des gammes d'étalonnage (Figure 2) :

- Le rapport signal sur bruit $S/N=10$
Ce critère a été appliqué sur la transition la plus intense parmi les quatre transitions cherchées de chaque peptide (Figure 2).
- Le coefficient de variation sur trois injections d'un point à LOQ (le point le plus bas de la gamme) ne doit pas dépasser 20%.
- La valeur recalculée de LOQ selon la droite de la gamme doit avoir une précision égale ou inférieure de 20%.

La LOD quant à elle est déterminée à condition que les 4 transitions soient détectées avec un rapport $S/N=3$.

Afin de déterminer la présence d'un peptide dans les échantillons biologiques, trois critères sont prises en considération :

- Les quatre transitions ont le même temps de rétention que dans la gamme. Ce temps de rétention est corrigé en fonction de temps de rétention de l'étalon analytique GF.
- Le coefficient de variation des trois injections de l'échantillon ne doit pas dépasser 15%.
- Pour chaque peptide, le rapport de ces transitions ne doit pas dépasser $\pm 15\%$ de la valeur la plus proche dans la gamme.

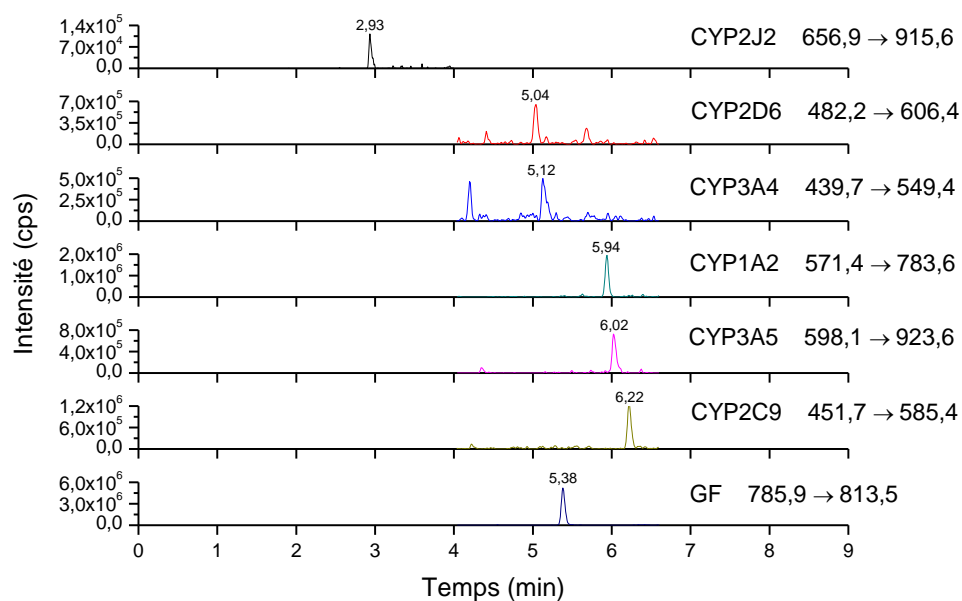


Figure (2) Chromatogrammes d'ion extrait de la transition la plus intense de chaque peptide à la LOQ (25 fmol) sauf P1_2J2, LOQ (12,5 fmol).

8.5.2.3 Paramètres du Synapt G2 lors du test d'activité

Tableau (11) Paramètres de source du Synapt G2 lors du test d'activité

Source Synapt G2	
Tension du capillaire	750 V
Température de source	120°C
Température de désolvatation	600°C
Débit de gaz de cone	20 L/h
Débit de gaz de désolvatation	900 L/h

IV. Résultats

1. Mise en place d'une méthode de dosages des CYPs par spectrométrie de masse

Une partie de ce chapitre se trouve dans la publication 1, cependant ce chapitre est plus détaillé et reporte les différents problèmes rencontrés dans ce travail. Les sections qui ne se trouvent pas dans la publication 1 sont marquées avec un *.

1.1 Sélection des peptides protéotypiques

L'étape clé dans la méthode de quantification par spectrométrie de masse est le choix des peptides protéotypiques c'est-à-dire spécifiques de chaque protéine et qui respectent certains critères afin d'être adaptés à l'analyse par couplage LC-MS.

1.1.1 Revue de la littérature sur la sélection des peptides protéotypiques*

Deux stratégies ont été utilisées pour identifier les peptides protéotypiques (PPs) dans la littérature (Figure 1) :

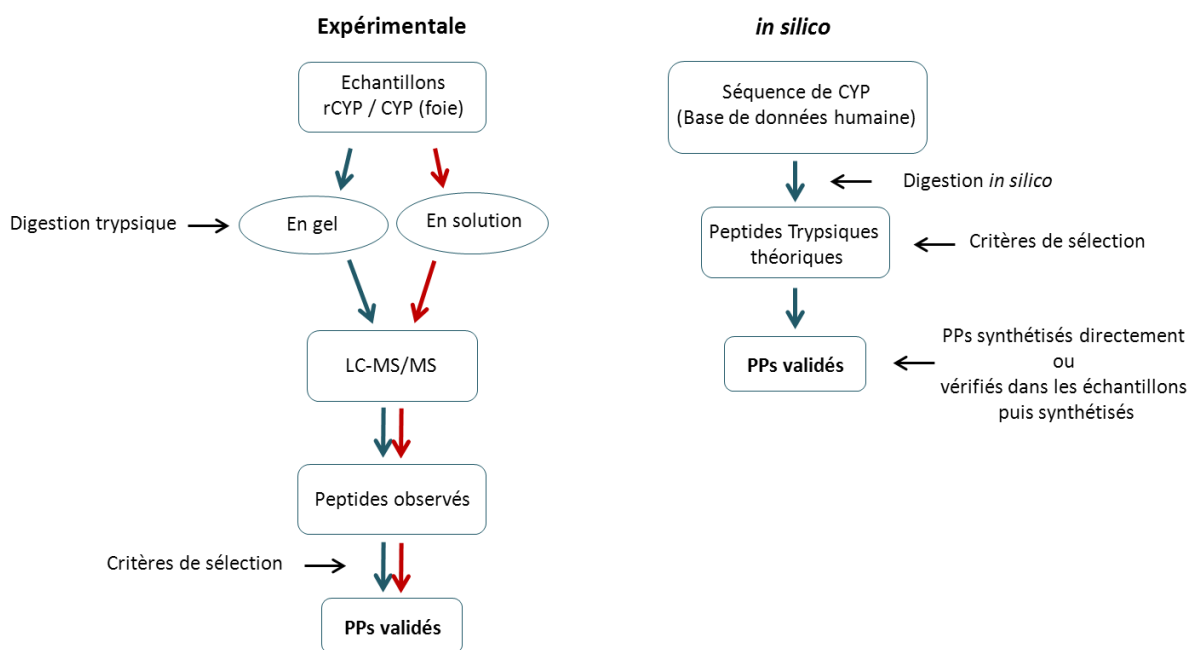


Figure (1) Les deux stratégies de sélection des PPs utilisées dans la littérature. Les flèches rouges représentent l'analyse *Shot-gun* (en solution ; sans gel). Les PPs validés sont finalement synthétisés afin de réaliser la quantification. rCYP : CYP recombinants.

1) Approche expérimentale fondée sur l'identification des PPs pour les protéines d'intérêt (CYPs) présentes dans les échantillons à quantifier ou surexprimées dans d'autres organismes (supersomes ou baculosomes) (CYP recombinants rCYP). Les protéines d'intérêt sont digérées après avoir été séparées sur gel ou digérées directement en solution (shot-gun). Ensuite, les peptides issus de la digestion trypsique sont analysés par LC-MS/MS. Une sélection est effectuée dans l'ensemble de tous les peptides identifiés afin d'utiliser seulement les peptides spécifiques d'une protéine pour leur quantification. Cette sélection a été effectuée selon les critères de sélection des peptides protéotypiques (PPs) discutés dans le chapitre d'introduction.

Cette stratégie a été employée par plusieurs équipes. Wang *et al.* ont sélectionné les PPs pour les CYPs (3A, 3A4 et 3A5) dans les digestions en gel des rCYP afin de les quantifier dans les microsomes de foie humain (Wang *et al.*, 2008). Kwakami *et al.* ont employé, quant à eux, l'analyse shot-gun. Par cette méthode, des digestions de supersomes (surexprimant chacun l'un des CYPs 1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 et 3A5) ont été analysées. Seulement 3 PPs ont été identifiés (un PP pour les CYPs 1A2, 2A6 et 2D6). Seibert *et al.* ont appliqué cette méthode afin d'identifier ces PPs directement dans les échantillons à quantifier, dans des microsomes de foie humain, soit par shot-gun soit après séparation des protéines des microsomes par gel SDS-PAGE (Seibert *et al.*, 2009). Les séquences des peptides protéotypiques (spécifiques) ont été vérifiées par la recherche BLAST (<http://expasy.org/tools/blast>) contre la base de données de protéines humaines.

Moskaleva *et al.* ont analysé la digestion des microsomes (foie de souris) avec un MS de type QTOF pour identifier les PPs (m/z d'ion précurseur et ses fragments). Ensuite, les fragments les plus intenses ont été vérifiés en mode MRM grâce à un MS triple quadripôle, où les transitions (couple ion parent-ion fragment) les plus intenses ont été choisies (Moskaleva *et al.*, 2011). Récemment, Shrivastava *et al.* ont appliqué cette stratégie de sélection sur 32 foies humains et des rCYP dans les bactosomes. Après séparation sur gel, les protéines ont été digérées puis les peptides tryptiques ont été analysés en LC-MALDI-TOF/TOF. Les PPs observés dans le plus grand nombre de foies ont été proposés comme les meilleurs candidats pour la quantification (Shrivastava *et al.*, 2013).

2) Approche *in silico* (théorique) consiste à digérer les séquences de protéines (les CYPs d'intérêt) de façon théorique par la trypsine. Les peptides utilisés ensuite pour l'analyse quantitative ont été alors sélectionnés sur la base de critères de sélection *in silico* (Tableau 1 (chapitre introduction)). Les séquences des peptides protéotypiques (spécifiques) ont finalement été vérifiées par la

recherche NCBI-BLAST (<http://expasy.org/tools/blast>) contre la base de données de protéines humaines (Kamii *et al.*, 2008), afin de vérifier la spécificité de cette séquence peptidique.

Cette stratégie a permis à Kwakami *et al.* d'identifier les PPs restants (pour les CYPs 2B6, 2C9, 2C19, 2C8, 2E1, 3A43, 3A4 et 3A5) non détectés par la stratégie expérimentale. Kwakami *et al.* ont finalement conclu, après avoir quantifié tous les peptides sélectionnés dans un pool de foie humain, que la méthode de sélection *in silico* était plus adaptée que la méthode shot-gun pour l'analyse des protéines à forte homologie de séquence comme les CYPs (Kwakami *et al.*, 2011).

La stratégie de sélection *in silico* a aussi été appliquée par plusieurs équipes pour déterminer les PPs des CYPs 1A2, 2E1 et 2C19 (Alterman *et al.*, 2005), 2D6 (Langenfeld *et al.*, 2009), 1A2, 2B6, 3A4 et 3A5 (Williamson *et al.*, 2011)).

1.1.2 Méthodologie appliquée

Au cours de mon travail, deux échantillons de microsomes de foie différents (FH4 et FH5) ont été séparés par gel SDS-PAGE afin de sélectionner les PPs. Les bandes entre 45 et 62 kDa (gamme de masse des CYPs) ont été coupées et digérées par la trypsine. Ces digestions ont ensuite été analysées par nano-ESI-MS/MS. La liste des peptides identifiés pour chaque isoforme a été recherchée contre la base de données humaine via un moteur de recherche FASTA 3 qui compare une séquence protéique ou nucléique à une banque de nature similaire. La liste des PPs pour chaque isoforme identifiée est présentée dans le tableau (1).

Tableau (1) La liste des PPs pour chaque isoforme. Les peptides possédant un **résidu méthionine** sont à éviter.

CYP	Peptide Protéotypique	CYP	Peptide Protéotypique
1A1	LWVNPSEFLPER	2E1	FGPVFTLYVGSQR
	SHLPY M EAFILETFR		FITLVPSNLPHEATR
	YLPNPSLNAFK		GDLPFAHAHR
1A2	VDLTPIYGLT M K		GIIFNNGPTWK
	ASGNLIPQEK	2J2	VIGQQQQPSTAAR
	DTTLNGFYIPK	3A4	G V V V MIPSYALHR
	IGSTPVLVLSR	3A5	DVEINGVFIPK
	TVQEHYQDFDK	3A7	FNPLDPFVLSIK
	YLPNPALQR	4A11	VWPNPEVFDPFRR
27A	ATGAPGAGPGVR	4F2	HVTQDIVLPDGR
	FFFQLFVQGYALQLHQLQVLYK		SVINASAAIAPK
	VVLAPETGELK	4F3	WQLLASEGSAR
2B6	DLIDTYLLH M EK	4F11	ILPTHTEPR
	NLQEINAYIGHSVEK	4F12	SITNASAAIAPK
	FHYQDQEFLK		FLPDHTEPR
	GYGVIFANGNR		LVHDFTDAVIR
	I A M V DPFFR	51A1	GVAYDVPNPVFLEQK
	TEAFIPFSLGK		IDDILQTLDDATYK
2A6	GYGVVFSNGER		NEDLNAEDVYSR
2C8	EHQASLDVNNPR		FAYVPFGAGR
	DQNFLTL M K		YLQDNPASGEK
	VQEEIDHVIGR	8B1	GTPPWLGHAM A FR
2C19	EHQES M DINNPR		SVQGDHE M IHSASTK
	NLAF M ESDILEK		WGFGT M QPSHDVR
2D6	AFLTQLDELLTEHR		EEATQVLGEAR
	DLTEAFLA M EK		FVYSLLWPR
	EVLNAVPLVLLHIPALAGK		LVHEDYTLK
	FGDIVPLGVTH M TSR		M LSVSHSSEK
	GNPESSFNDENLR		M SSGQEYLFR
	LLDLAQEGLK	POR	TYEHFNAM G K
	M TWDPAQPPR		

Cette méthode de sélection n'a pas permis l'identification de PPs compatibles avec les critères de sélection pour tous les CYPs d'intérêts. Un seul PP a été identifié pour le CYP3A4 (GVVVMIPSYALHR) mais présente une méthionine. Le seul PP identifié pour le CYP3A5 est précédé par la séquence KK ce qui peut poser un problème en cas de digestion incomplète. C'est

pourquoi, dans un deuxième temps, une autre stratégie a été développée afin de choisir et valider les PPs pour la quantification (Figure 2).

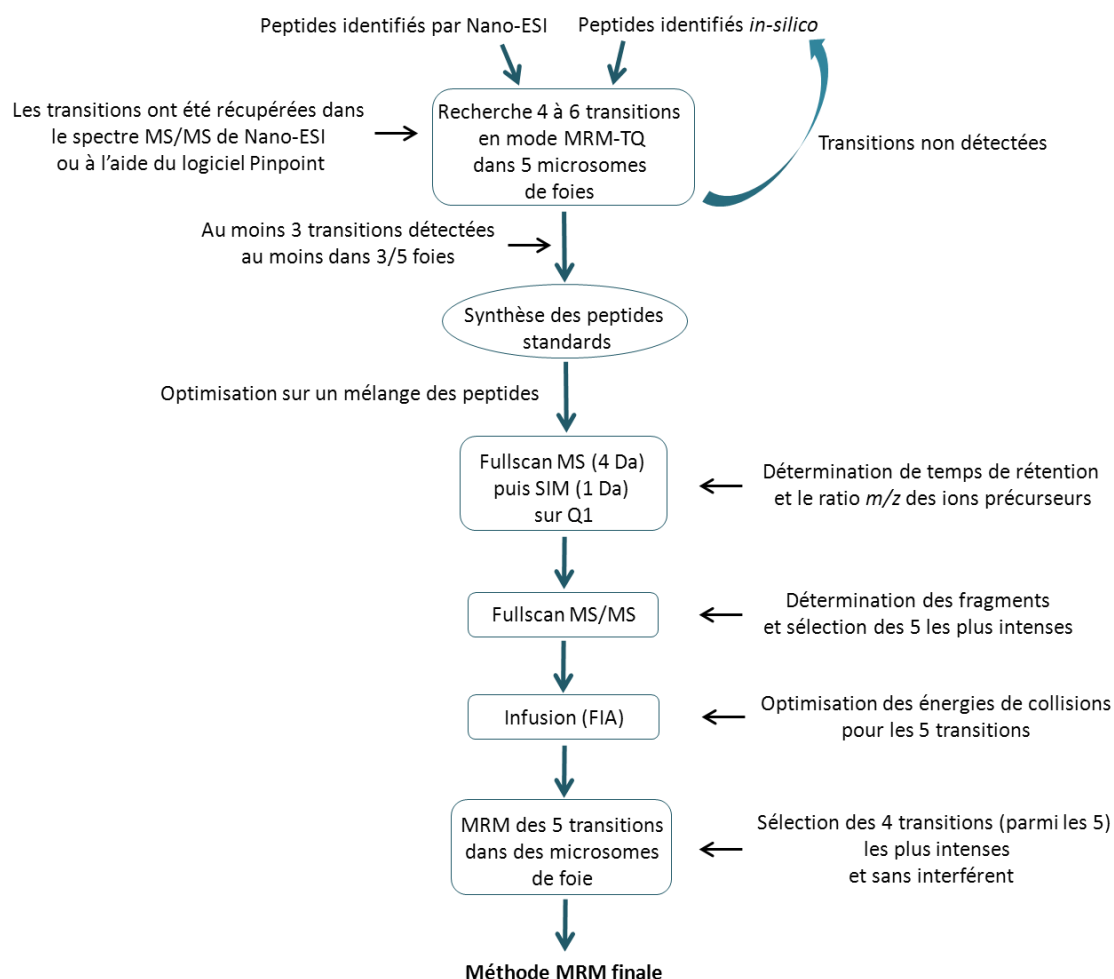


Figure (2) Stratégie de sélection des PPs et optimisation de la méthode MRM.

Deux sources ont été utilisées pour récupérer les informations sur les PPs. Premièrement, les PPs ont été identifiés par analyse Nano-ESI-MS/MS des échantillons de microsomes de foie humain pour les CYPs exprimés dans le foie ou dans différents systèmes d'expressions (levures, baculosomes et lignées cellulaires) comme pour le cas de CYP2U1 (détaillé dans le paragraphe suivant). En cas d'échec de cette première étape, la digestion *in silico* et les informations publiées (si elles sont disponibles) sont utilisées afin d'identifier des PPs valides pour la quantification. Les peptides identifiés par la stratégie détaillée dans la figure (1) sont listés dans le tableau (2). Les fragments les plus intenses observés dans le spectre MS/MS ont été choisis afin d'optimiser la méthode MRM. Liao *et al.* ont choisi seulement les ions avec des rapport m/z supérieurs à celui de l'ion précurseur car ces fragments ont tendance à être plus intenses et il y a moins de bruit

dans cette région du spectre (Liao *et al.*, 2010). Nous n'avons pas utilisé systématiquement ces critères puisque les mêmes résultats expérimentaux n'ont pas été retrouvés.

Tableau (2) Description des PPs déterminés par notre stratégie, un symbole a été assigné pour chaque peptide pour sa citation ultérieure dans le texte.

CYP	Peptide Protéotypique	Symbole
2D6	DIEVQGFR	P_16
3A4	EVTNFLR	P_17
2C9	GIFPLAER	P_18
3A5	LDTQGGLQPEKPIVLK	P_13
3A4	LSLGGLQPEKPVVLK	P_15

Cette stratégie a aussi été appliquée pour chercher les PPs de CYP2U1 (voire chapitre résultats 1.12). Plusieurs systèmes d'expression (levures, baculosomes et *E. Coli*) ont été analysés par nano-ESI-MS/MS. Les peptides caractérisant le CYP2U1 ont été identifiés dans le système *E. coli* et les baculosomes, mais pas dans celui de levure. Le seul PP identifié dans les baculosomes se termine par la séquence KK. La digestion de CYP2U1 *in silico* a été aussi utilisée (Tableau 3)

Tableau (3) les peptides à (PPs) correspondants au CYP2U1 identifiés *in silico*.

PPs du CYP2U1	Statut
APLGLLR	Non détecté ^a
APSLTDK	Non détecté
FDYTNSEFK	suivi par K
FLDDQGQLIK	suivi par K
GVVFAHYGPVWR	Détecté, problème de stabilité
GTLILPNLWSVHR	Non détecté

^a Le peptide APLGLLR a été utilisé dans la référence (Shawahna *et al.*, 2011) afin de quantifier le CYP2U1 dans des micro vaisseaux de cerveau Humain.

1.2 Comparaison de la sensibilité des analyseurs triple-quadripôle et hybrides quadripôle/ temps-de-vol*

Certaines isoformes sont exprimées avec une faible abondance dans certains organes comme pour le CYP2J2 dans le foie et le CYP2U1 dans le cerveau. Avoir une méthode suffisamment sensible est indispensable pour être capable de quantifier les CYPs dans les différents organes.

Premièrement, 3 peptides identifiés par Nano-ESI-MS/MS ont été synthétisés : P1_2J2 (VIGQGQQPSTAAR), P3_1A2 (IGSTPVLVLSR) et P5_2D6 (AFLTQLDELLTEHR). Afin d'évaluer la sensibilité et la linéarité du signal de chaque peptide, deux instruments (triple quadripôle et hybride quadripôle/ temps-de-vol) utilisant différents modes d'analyses (SIM, et MRM) et couplés à une chaîne UPLC ont été évalués.

Une gamme d'étalonnage a été réalisée à partir de la solution mère à 1 μ M de chaque peptide avec des quantités injectées de 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10 et 5 fmol. Chaque point a été injecté en triplicat (Figure 3), (Tableau 4). Les gammes sont préparées dans l'eau. Un gain d'un facteur 2 en mode SIM_TQ et un facteur 3 à 4 a été remarqué en mode MRM_TQ par rapport au mode SIM_Synapt. Un problème de collage a été identifié avec P5_2D6 qui n'a pas permis la réalisation d'une gamme dans l'eau (détails ci-dessous).

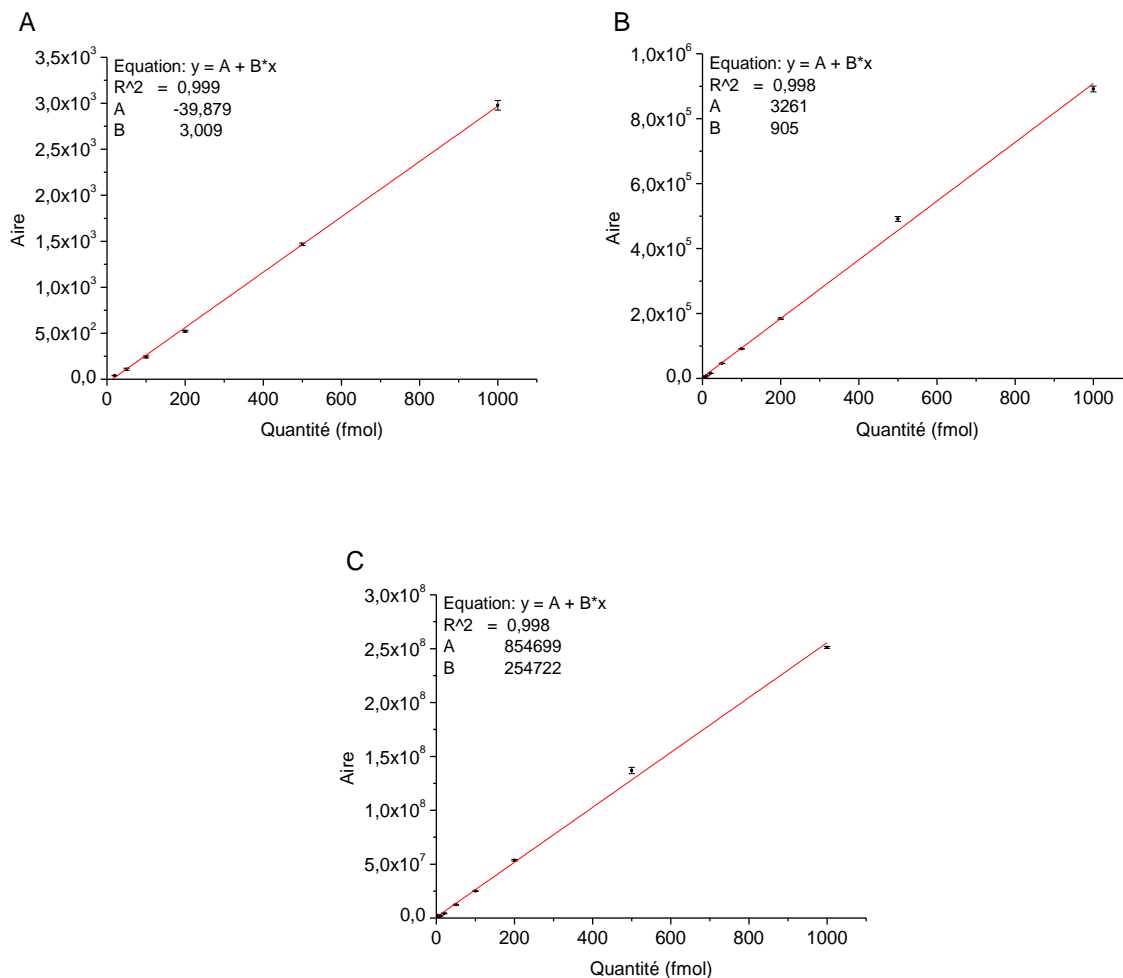


Figure (3) Courbes d'étalonnage pour le peptide P3_1A2

A. en mode SIM, Synapt G2, LOQ=20 fmol, CV=0.5-11%, B. en mode SIM, TSQ Vantage, LOQ=10 fmol, CV=0.8-9%, C. en mode MRM, TSQ Vantage, LOQ<5 fmol, CV=0.3-11%.

Tableau (4) Comparaison entre les différents modes d'acquisition pour chaque appareil, pour deux peptides protéotypiques.

Peptide	Mode d'acquisition/ appareil	Gamme de concentration étudiée (fmol injectés)	CV (%)	Équation	R ²	LOQ	Gain de sensibilité
P1_2J2	SIM_Synapt	20,50,100,200,500 et 1000	0,18 -10	$y = 0,24x - 1,42$	0,999	20 fmol	+
P1_2J2	SIM_TQ	10,20,50,100,200,500 et 1000	1 -5	$y = 74,3x + 365,9$	0,998	10 fmol	++
P1_2J2	MRM_TQ	5,10,20,50,100,200,500 et 1000	0,8 -16	$y = 28393x - 267984$	0,999	5 fmol	+++
P3_1A2	SIM_Synapt	10,20,50,100,200,500 et 1000	0,5 -10	$y = 3x - 40,1$	0,999	20 fmol	+
P3_1A2	SIM_TQ	5,10,20,50,100,200,500 et 1000	0,8 -9	$y = 905,2x + 3261$	0,998	10 fmol	++
P3_1A2	MRM_TQ	5,10,20,50,100,200,500 et 1000	0,3 -10	$y = 254722x + 854699$	0,998	< 5 fmol	+++

Les paramètres optimisés pour chaque appareil en fonction du mode d'acquisition sont présentés dans le tableau (5).

Tableau (5) Les paramètres optimisés pour chaque appareil en fonction du mode d'acquisition.

Mode d'acquisition/appareil	Type de données	Temps de scan (s)	Fenêtre de scan(Da)	Pression de gaz de collision (Pa)
SIM_Synapt	Mode Centroïde	0,200	0,5	-
SIM_TQ	Mode Centroïde	0,020	0,1	-
MRM_TQ	Mode Profil	0,050	1	0,16

Une digestion de microsome de foie a été testée en utilisant les trois modes SIM_Synapt, SIM_TQ et MRM_TQ. Les peptides P3_1A2 et P5-2D6 ont seulement été détectés en mode MRM_TQ. Nous avons donc orienté notre choix vers un couplage LC-ESI en mode MRM sur un triple quadripôle pour quantifier les CYPs dans les matrices biologiques. Ce couplage LC-ESI en mode MRM a été le choix d'une grande partie des études de quantification des CYPs dans les échantillons humains (Chapitre introduction).

1.3 Optimisation de la digestion trypsique

La méthode AQUA compare les signaux des peptides standards ajoutés et des peptides natifs libérés pendant la digestion. La reproductibilité, l'efficacité et la spécificité de la digestion des protéines constituent des facteurs clés pour une quantification précise en protéomique, surtout dans des échantillons complexes comme le cas des CYPs dans le microsome de foie. Plusieurs paramètres ont été optimisés : type de digestion (en gel/en solution), utilisation de détergents, type de trypsine et digestion complète. Plus tard, une étape d'ajout de PPs standards dans la gamme fut réalisée afin d'évaluer l'effet des réactifs, utilisés lors de la digestion, sur la stabilité de ces PPs standards.

1.3.1 Digestion en gel ou en solution

Le choix de la méthode de digestion en gel ou en solution a été évalué par plusieurs équipes. Havliš et Shevchenko ont comparé la quantification des protéines digérées en gel ou en solution (Havliš and Shevchenko, 2004). Des quantités connues de BSA et de glucose-6-phosphate dehydrogenase (GPD) ont été digérées puis dopées par des quantités connues de peptides standards marqués ^{18}O comme étalons internes.

Dans cette étude, la digestion en solution a montré une meilleure efficacité et précision par rapport à la méthode en gel. Premièrement, l'efficacité de la digestion en gel pourrait être plus

faible et pourrait induire différents sites de digestion. Deuxièmement, une perte de peptides peut survenir lors de l'extraction du gel après la digestion par adsorption sur le gel. Le problème de rendement d'extraction a été corrigé en ajoutant les étalons internes avant l'étape d'extraction.

Afin de quantifier le CYP2D6 dans des microsomes de foie humain, Langenfeld *et al.* ont décidé de séparer les protéines de microsomes sur gel au lieu d'effectuer une digestion directe (en solution) (Langenfeld *et al.*, 2009). L'avantage du gel est qu'il permet la réduction de complexité de l'échantillon en séparant les protéines selon leur masse moléculaire, la normalisation des propriétés des échantillons avant la digestion et l'analyse par MS, quelles que soient les différentes matrices utilisées. De plus, le gel permet de supprimer les inhibiteurs de la protéase utilisés pour conserver les échantillons. Le fait d'ajouter l'étalon interne marqué avant la digestion a compensé les différences dans l'efficacité d'extraction des peptides du gel. L'efficacité de la méthode a été vérifiée en analysant des quantités connues de 2D6 recombinant purifié.

Seibert *et al.* ont utilisé la digestion en gel pour quantifier deux CYPs et ils ont réalisé une quantification relative des CYPs en gel et en solution, plus de PPs ont été identifiés par la digestion en solution. Shrivastava *et al.* ont utilisé récemment la digestion en gel avec un couplage LC-MALDI-MS/MS pour identifier les PPs de CYPs et les quantifier relativement (Shrivastava *et al.*, 2013).

L'étape de séparation des protéines sur un gel est laborieuse et très chronophage. C'est pour cette raison que plusieurs équipes ont préféré la digestion directe en solution (gel-free). **Nous avons donc optimisé la digestion trypsique en solution.**

1.3.2 Utilisation de détergents

Les CYPs sont des protéines membranaires hydrophobes. Il est donc souhaitable d'utiliser des produits qui améliorent la solubilisation de ces protéines et facilitent la digestion trypsique en solution. Ces produits peuvent être des détergents ou des chaotropes. Ces produits doivent être compatibles avec la trypsine et l'analyse LC-MS ou avec la possibilité de les enlever avant l'analyse (Speers and Wu, 2007).

Proc *et al.* ont étudié les effets d'agents chaotropes (chlorhydrate de guanidine, urée), détergents (dodecyl sulfate de sodium (SDS) and deoxycholate de sodium (SDC)), des solvants (acétonitrile, méthanol, trifluoroéthanol) sur l'efficacité de la digestion trypsique des protéines de plasma humain (Proc *et al.*, 2010). Ils ont trouvé que le SDC produit l'un des rendements les plus élevés de digestion (~ 80%), avec la reproductibilité la plus élevée (<5% d'erreur). Le SDC a aussi donné le meilleur résultat dans étude récente sur la digestion des protéines mitochondriales (León *et al.*, 2013).

Différents détergents ont été utilisés dans la littérature pour quantifier les CYPs: Brij 35 0.005% (Wang *et al.*, 2008), octyl β -D- glucopyranoside (OGS) 1% (Williamson *et al.*, 2011), 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate (BMIM BF₄) 5% (Sun *et al.*, 2012), RapiGest SP 0,2% et cholate de sodium 0,2% (Liao *et al.*, 2010).

Le cholate de sodium, un détergent classique pour la purification des CYPs, est un détergent de type sels d'acides biliaires tandis que le RapiGest est un détergent ionique. Les deux sont compatibles avec la trypsine (jusqu'à 2% cholate et ~0.1% Rapigest, concentration finale) et peuvent être enlevés en les précipitant par une étape d'acidification (Speers and Wu, 2007) afin d'éviter les interférences avec l'analyse LC-MS. Le cholate de sodium est 100 fois moins onéreux que le RapiGest. Liao *et al.* ont comparé le RapiGest SP 0,2% et le cholate de sodium 0,2% pour quantifier le CYP11A1 dans les Cortico-surrénales et ont trouvé des quantités de protéine très proches (95,1 pmol/mg en cas de RapiGest et 106,4 pmol/mg en cas de cholate de sodium). Nous avons aussi comparé les deux détergents et avons trouvé des résultats proches (Tableau 6) Nous avons donc sélectionné le cholate de sodium pour la digestion pour des raisons économiques.

Tableau (6) La différence entre Cholate de sodium et RapiGest SP.

	La différence (%)		
	P1_2J2	P3_1A2	P5_2D6
Cholate de sodium 2% vs RapiGest SF 2%	1	3	0,5

La différence (%) = (Aire de pic pour le Rapigest - Aire de pic pour le Cholate Na)/ Aire de pic pour le Cholate Na \times 100. Le test a été réalisé en utilisant la trypsine « sequencing grade modified trypsin » (Promega).

Des chaotropes ont été aussi utilisés pour solubiliser les CYPs et faciliter la digestion (guanidine hydrochloride 7M, urée 6M) (Ohtsuki *et al.*, 2011; Ohtsuki *et al.*, 2012; Schaefer *et al.*, 2012).

1.3.3 Le type de trypsine

Plusieurs études de quantification des CYPs par MS ont été réalisées en digérant les protéines par la trypsine de type « sequencing grade modified trypsin » (Promega) (trypsine 1) qui est modifiée pour éviter l'autolyse potentielle. Liao *et al.* ont comparé la trypsine 1 de Promega et la trypsine de type « trypsin type IX-S from porcine pancreas » (Sigma-Aldrich) (trypsin 2) pour

quantifier le CYP11A1 dans les cortico-surrénales et ont trouvé des résultats proches (104,4 pmol/mg pour la trypsine 1 et 106,4 pmol/mg pour la trypsine 2) (Liao *et al.*, 2010). Burkhat *et al.* ont testé plusieurs types de trypsines commerciales dont la trypsine 1 et 2. Dans leur étude, la trypsine 1 a donné l'intensité de signal la plus élevée et la trypsine 2 a été classée quatrième au niveau de l'intensité de signal (Burkhart *et al.*, 2012). Les deux types de trypsine 1 et 2 ont été testées sur deux échantillons (microsome et mitochondrie de foie humain) dans notre laboratoire et des résultats proches ont été trouvés (Tableau 7) donc la trypsine 2 de Sigma a été sélectionnée pour la digestion sachant que la trypsine de sigma est 100 fois moins onéreuse que celle de Promega.

Tableau (7) La différence entre deux types de trypsine 1 (Promega) et 2 (Sigma) utilisées à (2%).

	La différence (%)		
	P1_2J2	P3_1A2	P5_2D6
Trypsine 2 vs Trypsine 1 (Microsome)	-2	-7	-6
Trypsine 2 vs Trypsine 1 (Mitochondrie)	-4	-5	-7

La différence (%) = (Aire de pic pour la trypsine 2 - Aire de pic pour la trypsine 1) / Aire de pic pour la trypsine 1 × 100

1.3.4 La durée de la digestion

La durée de la digestion, comprise entre 12h et 16h, a été optimisée par plusieurs équipes. Nous avons choisi une digestion de 16h.

1.3.5 La digestion complète

Des équipes ont vérifié la digestion complète pour d'autres protéines que les CYPs par WB (Sato *et al.*, 2012a) ou par séparation sur une colonne monolithique et détection UV à 214 nm (Burkhart *et al.*, 2012). Afin d'évaluer l'efficacité de la digestion, les digestions de 3 microsomes et 3 mitochondries ont d'abord été analysées par MALDI-TOF en mode linéaire. L'absence de signaux à m/z élevés illustre un bon rendement de la digestion. En deuxième temps, ces digestions ont analysées par nano-LC-MSMS. Le logiciel RawMeat 2,1 (VAST scientifique) a été utilisé en cherchant les peptides ayant une charge élevée, signe de plusieurs « missed clivages » probables, significatifs d'une digestion incomplète (Figure 4). La majorité des peptides observés sont doublement ou triplement chargés ce qui indique une digestion plutôt complète.

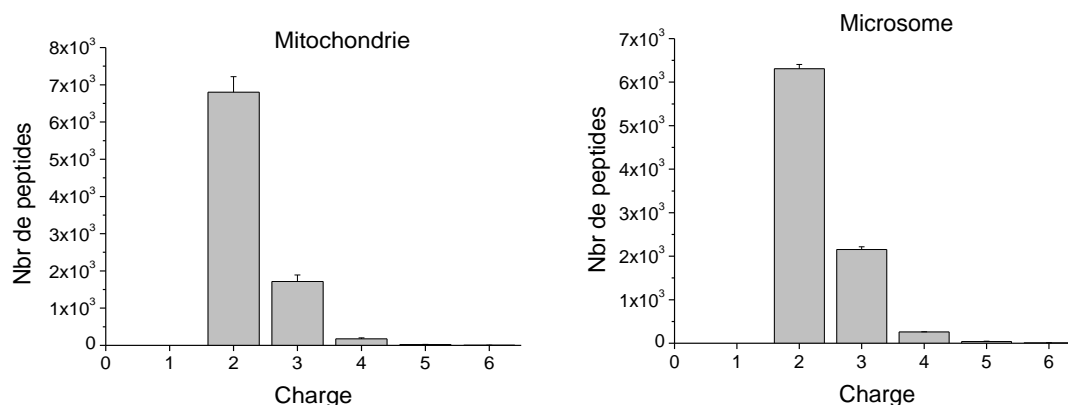


Figure (4) État de charge des peptides tryptiques observés dans les digestions de 3 HLMs et 3 mitochondries.

1.4 Linéarité de la méthode MRM dans les échantillons biologiques et l'étape d'ajout des PPs standards

Afin d'évaluer la capacité de notre méthode MRM à détecter différents niveaux d'expression des CYPs dans les échantillons réels, deux types d'échantillons ont été utilisés :

1. Des cellules HepG2 surexprimants des quantités croissantes d'un CYP.
2. Microsome d'un foie dans lequel un isoforme n'est pas détectable. Ceci sera ajouté avec des quantités croissantes d'un CYP. Le but de cet ajout est d'évaluer la linéarité de la méthode et dans un deuxième temps d'évaluer l'étape d'ajout du peptide standard avant ou après la digestion.

1.4.1 Linéarité de l'expression des CYPs dans les cellules HepG2

Afin de tester la linéarité de réponse en spectrométrie de masse en mode MRM en fonction de la quantité de protéine exprimée dans les échantillons biologiques, nous avons analysé des microsomes des cellules HepG2 qui expriment les CYPs 1A2 ou 2J2 à différents niveaux selon le nombre de virus utilisé pour infecter les cellules. Les échantillons analysés correspondent à des cellules infectées par 5, 10 et 15 MOI pour le CYP2J2 et par 25, 50, 100 et 150 MOI pour le CYP1A2 (La multiplicité d'infection ou MOI correspond au nombre de particules virales infectieuses par cellule). Une bonne linéarité de réponse a été trouvée en fonction du niveau d'expression (Figure 5).

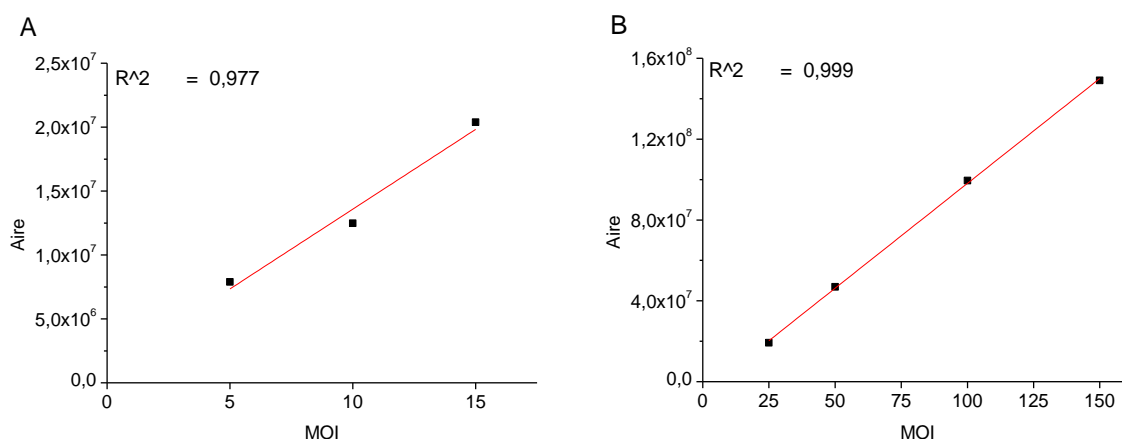


Figure (5) Linéarité de la méthode A. HepG2_2J2 5,10 et 15 MOI, le P1_2J2 a été suivi pour déterminer la quantité relative en CYP2J2, B. HepG2_1A2 25, 50, 100 et 150 MOI, le P3_1A2 a été suivi pour déterminer la quantité relative en CYP1A2

1.4.2 Linéarité par ajout de PP dans des échantillons de foie humain

Dans un premier temps, nous avons utilisé P1_2J2 afin d'évaluer la linéarité et l'étape d'ajout des PPs standards dans le foie humain.

Le CYP2J2 n'a pas été trouvé dans le foie (FH5) par nano-ESI-MS/MS ni en mode MRM ni par WB. Des microsomes de foie (FH5) peuvent donc être utilisés comme matrice blanche afin de préparer une gamme de P1_2J2 en ajoutant le P1_2J2 en concentration variant de 25 à 1000 fmol après digestion (Figure 6).

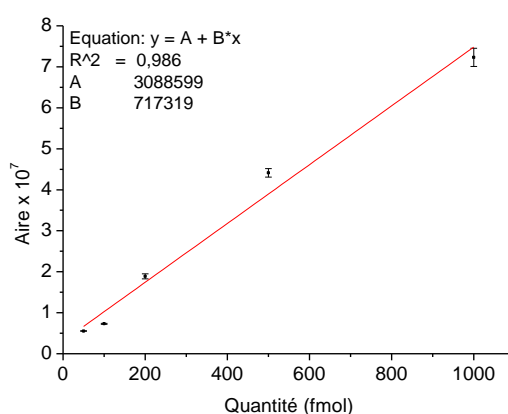


Figure (6) Linéarité de la méthode dans le microsome de foie humain pour P1_2J2

1.5 Evaluation de l'étape d'ajout des peptides protéotypiques standards

Dans la littérature, toutes les études de quantification des CYPs par la méthode AQUA (en solution) ont été réalisées en ajoutant les peptides standards (l'étalon interne marqué) après la digestion tryptique. Pour les deux études publiées avec la méthode AQUA (en gel), les PPs ont été ajoutés dans le gel avant la digestion. Nous avons évalué la méthode la plus performante en termes de quantification avec un ajout avant ou après digestion.

1.5.1 Foie humain

L'étape d'ajout des PPs standards a été testée dans un premier temps en utilisant P1_2J2 dans le microsome de foie humain (FH5).

Le peptide P1_2J2 a été ajouté avant ou après la digestion dans 40 µg de protéines microsomales en injectant de 25 à 1000 fmol. Seule une fraction de ce mélange correspondant à 4 µg de protéine a été injectée sur la colonne. Chaque point de la gamme a été injecté en triplicat (Figure 7).

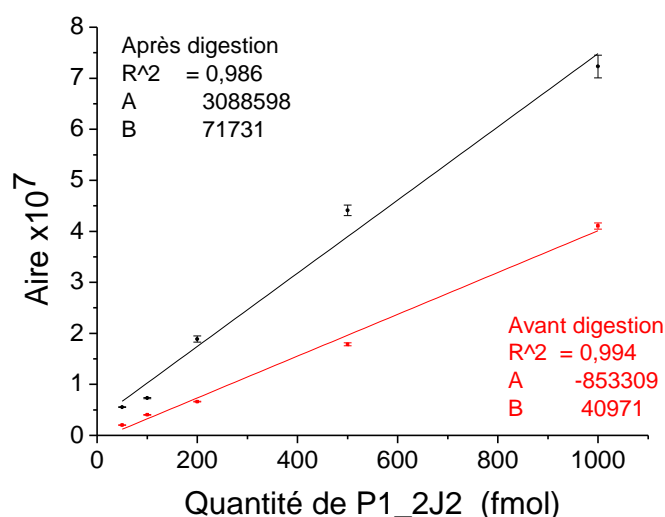


Figure (7) Etape d'ajout du PP : le peptide P1_2J2 est ajouté avant la digestion (ligne rouge), le peptide P1_2J2 est ajouté après la digestion (ligne noire).

Une perte d'intensité d'un facteur 2 et une amélioration de la linéarité ont été remarquées en ajoutant le peptide P1_2J2 avant la digestion par rapport au cas de l'ajout après la digestion. Cependant, malgré cette perte de sensibilité, l'ajout de peptides standards avant l'étape de digestion permet de s'assurer que les peptides naturels ciblés et ceux de référence sont soumis aux mêmes traitements au cours du processus analytique suivant.

1.5.2 Cellules HepG2

Dans un deuxième temps, le microsome de lignée cellulaire HepG2 vide (Mic_HepG2) a été utilisé pour évaluer la linéarité des PPs ajoutés avant et après la digestion (Figure 8).

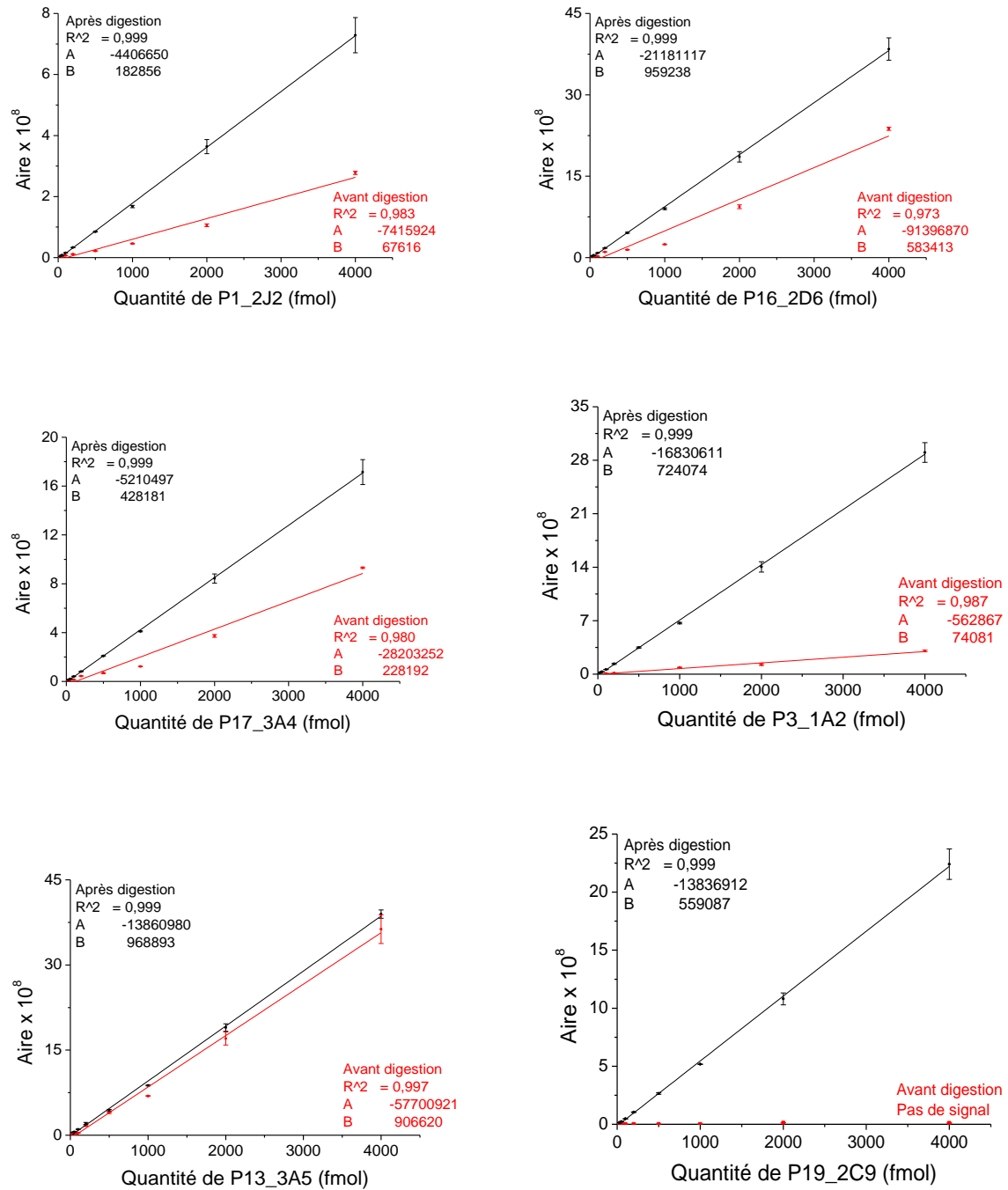


Figure (8) Comparaison des gammes d'étalonnage réalisées avant (ligne rouge) et après (ligne noire) la digestion dans la matrice (Mic_HepG2).

Des problèmes de linéarité (P17_3A4, P16_2D6) et d'intensité (P3_1A2) ont été observés dans le cas d'ajout des PPs avant digestion. Le P13_3A5 est le moins touché par l'étape d'ajout. Le P19_2C9 quant à lui n'a pas été détecté quand il est ajouté avant la digestion. Cela nous conduit à réévaluer la digestion trypsique en prenant le cas de P19_2C9 (Ci-dessous).

1.6 Problèmes expérimentaux*

1.6.1 Effet de l'alkylation par l'iodoacetamide sur les peptides ajoutés avant la digestion

Lors de la préparation d'une gamme d'étalonnage d'un mélange de peptides standards ajoutés avant la digestion, avec des quantités de 25 à 4000 fmol, le signal correspond au peptide P19_2C9 (GIFLAER) n'est pas détecté (Figure 9) tandis qu'il est présent lorsque la gamme est réalisée dans l'eau ou que le peptide est ajouté dans la matrice après la digestion (Figure 10,11).

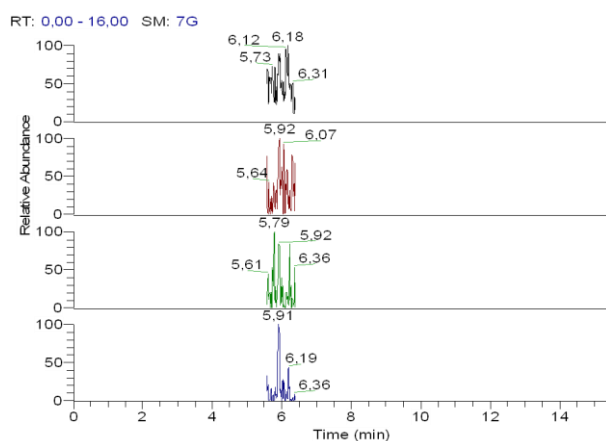


Figure (9) Chromatogrammes d'ions extraits pour le peptide P19_2C9, ajouté dans la matrice avant la digestion (2000 fmol injectées).

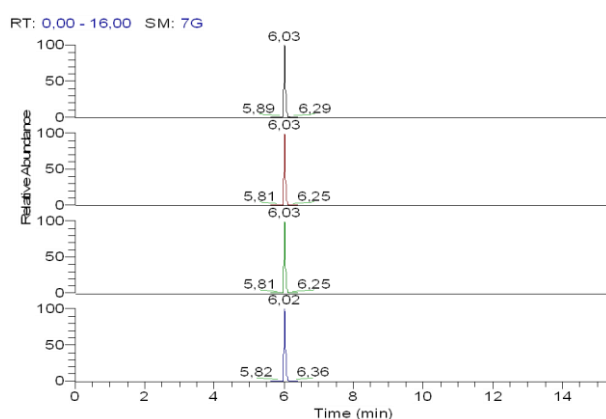


Figure (10) Chromatogrammes d'ions extraits pour le peptide P19_2C9, ajouté dans l'eau (2000 fmol injectées).

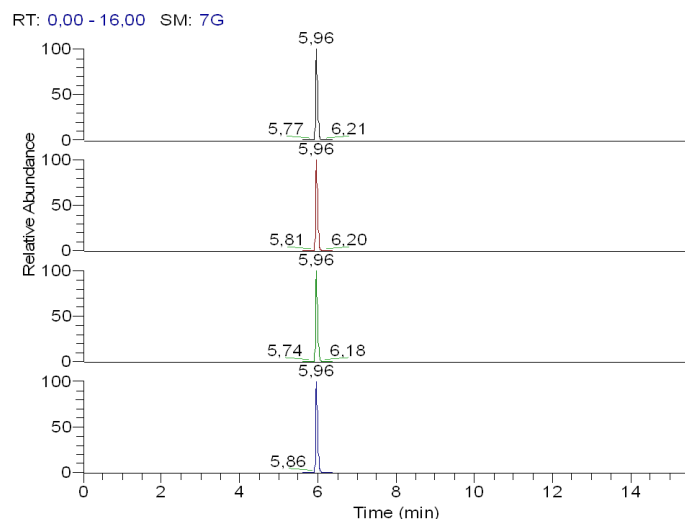


Figure (11) Chromatogrammes d'ions extraits pour le peptide P19_2C9, ajouté dans la matrice après la digestion (2000 fmol injectées).

Ces résultats nous conduisent à penser qu'un réactif utilisé pendant la digestion pourrait gêner la quantification du P19_2C9. Le seul réactif qui peut réagir avec les peptides est l'iodoacétamide. L'iodoacétamide est un agent alkylant qui se lie de façon covalente avec le groupe thiol de la cystéine mais il peut aussi réagir avec le groupement N-terminal ou l'histidine (Boja and Fales, 2001) et le C-terminal (Yang and Attygalle, 2007).

Afin d'évaluer la cause de ce phénomène, deux points de la gamme à 100 et 2000 fmol ont été préparés en ajoutant les peptides avant la digestion mais sans l'étape d'alkylation par l'iodoacétamide. (Figure 12). Les quatre transitions de P19_2C9 ont été détectées avec de bonne intensité.

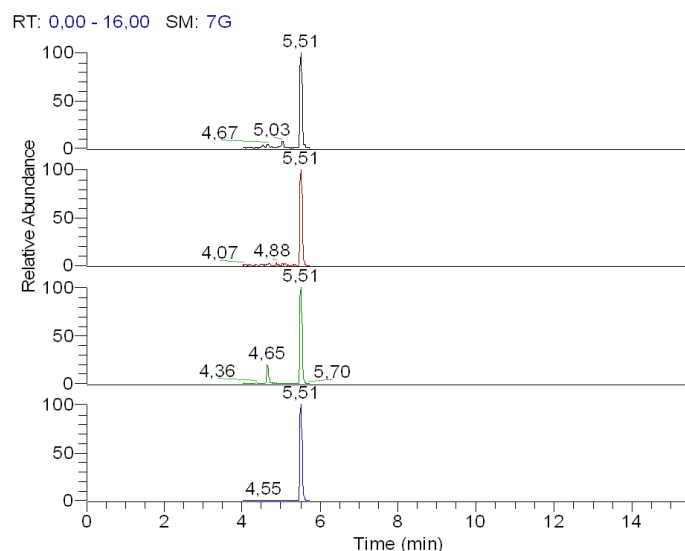


Figure (12) Chromatogrammes d'ions extraits pour le peptide P19_2C9, ajouté dans la matrice avant la digestion (2000 fmol) sans l'étape de l'alkylation par l'iodoacétamide.

Afin de confirmer l'effet de l'iodoacétamide sur nos peptides, des analyses MALDI ont été réalisées. Un mélange des peptides standards est réduit par le DTT et alkylé par IAA puis incubé à 37°C pendant 16h, puis analysé par la technique MALDI en mode MS et MS/MS. L'analyse MALDI-MS montre la présence d'un pic intense qui correspond à la masse du peptide et un autre pic moins intense correspondant à la masse du peptide plus 57 Da, équivalant à une carbamidométhylation par l'iodoacétamide.

Pour déterminer la position de cette modification, une analyse MS/MS est effectuée, et le spectre MS/MS met en lumière l'alkylation de l'acide aminé en N-terminal (Figure 13).

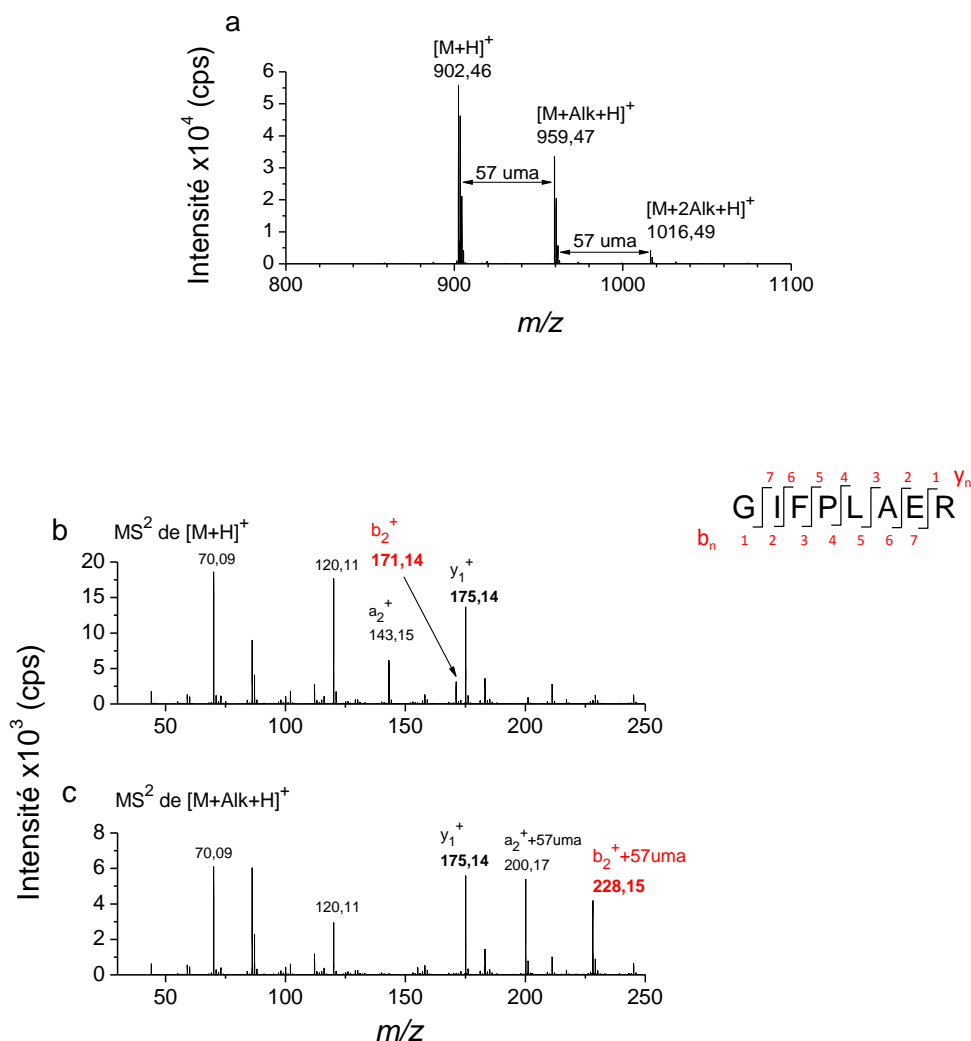


Figure (13) Analyse MALDI du P19_2C9, incubé avec de l'IAA (a). Spectres MS² du P19_2C9 non alkylé (b) et alkylé (c).

En comparant les deux spectres MS/MS pour le peptide non alkylé et le peptide alkylé on remarque que l'alkylation est portée en N-terminal : Les ions y_1 , y_5 , y_6-NH_3 et y_7 ont le même ratio m/z . Les ions b_2 , b_3 et b_4 sont déplacés de + 57 Da (carbamidométhyle).

Afin d'éviter cette sur-alkylation qui altère les peptides d'une manière différente et aléatoire, deux points de gamme à 100 et 1000 fmol sont préparés en présence de concentrations différentes de cystéine à 30, 150, 300 et 600 mM. En comparant les aires de pics obtenus, la cystéine à 300 mM est utilisée pour les gammes et les échantillons de foie. La cystéine dans ce cas est utilisée pour neutraliser l'excès en agent alkylant.

L'intérêt de l'ajout de cystéine a été vérifié dans la matrice en préparant deux gammes sans et avec la cystéine, et dans HLMs en préparant le même échantillon deux fois sans et avec la cystéine (Figure 14) et (Tableau 8).

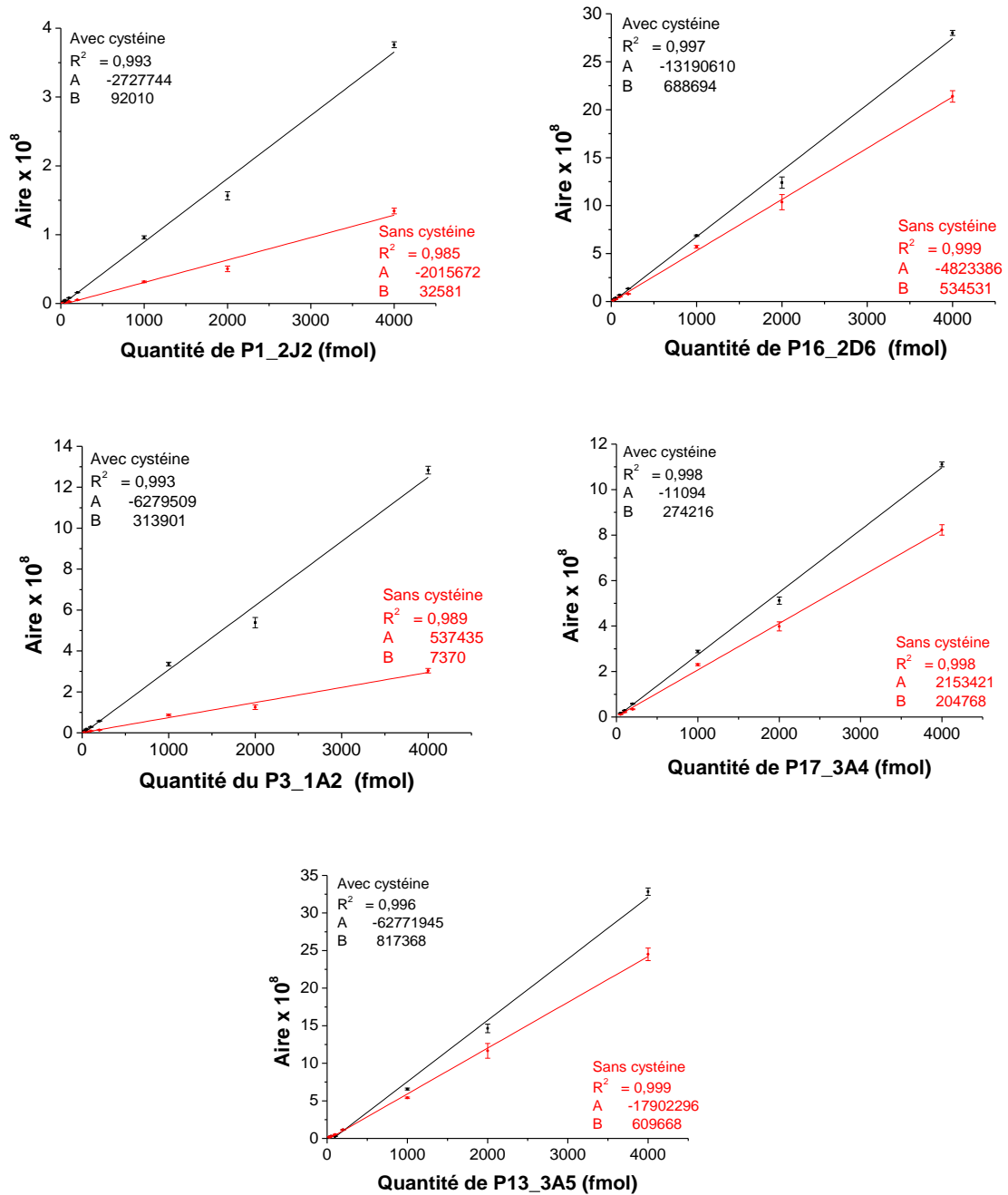


Figure (14) Courbes d'étalonnage des PPs dans la matrice (Mic_HepG2) avant digestion avec (ligne noire) et sans (ligne rouge) cystéine et sans AS.

Tableau (8) Comparaison des aires de pic pour un échantillon de HLMS sans et avec la cystéine ; en rouge les valeurs inférieures à la LOQ.

Peptide	Aire de pic	
	Sans cystéine	Avec cystéine
P1_2J2	1 306 833	2 307 047
P16_2D6	14 337 933	28 845 025
P17_3A4	80 701 053	124 294 873
P3_1A2	4 430 495	17 749 254
P13_3A5	98 242 187	120 461 930
P19_2C9	4 709 300	25 262 173

En neutralisant l'iodoacétamide libre avec la cystéine, un gain d'intensité d'un facteur 4 pour P3_1A2 a été démontré. Dans la digestion de foie, des gains d'un facteur 4 (P3_1A2) et 5 (P19_2C9) ont été mis en lumière et les aires de pic correspondantes à ces peptides augmentent pour être dans le domaine dynamique de la gamme (supérieur à la LOQ).

L'étape d'ajout des PPs avant ou après la digestion est réévaluée en présence de la cystéine. Une comparaison entre la gamme préparée avant la digestion avec la cystéine et la gamme préparée en ajoutant les PPs après la digestion a été réalisée. La cystéine diminue la différence entre les deux gammes mais une perte d'intensité jusqu'à 20% (8, 15, 6, 15, 15, 20% pour PPs de 2J2, 2D6, 3A4, 1A2, 3A5 et 2C9, respectivement) est remarquée en cas d'ajout des PPs avant la digestion (Figure 15).

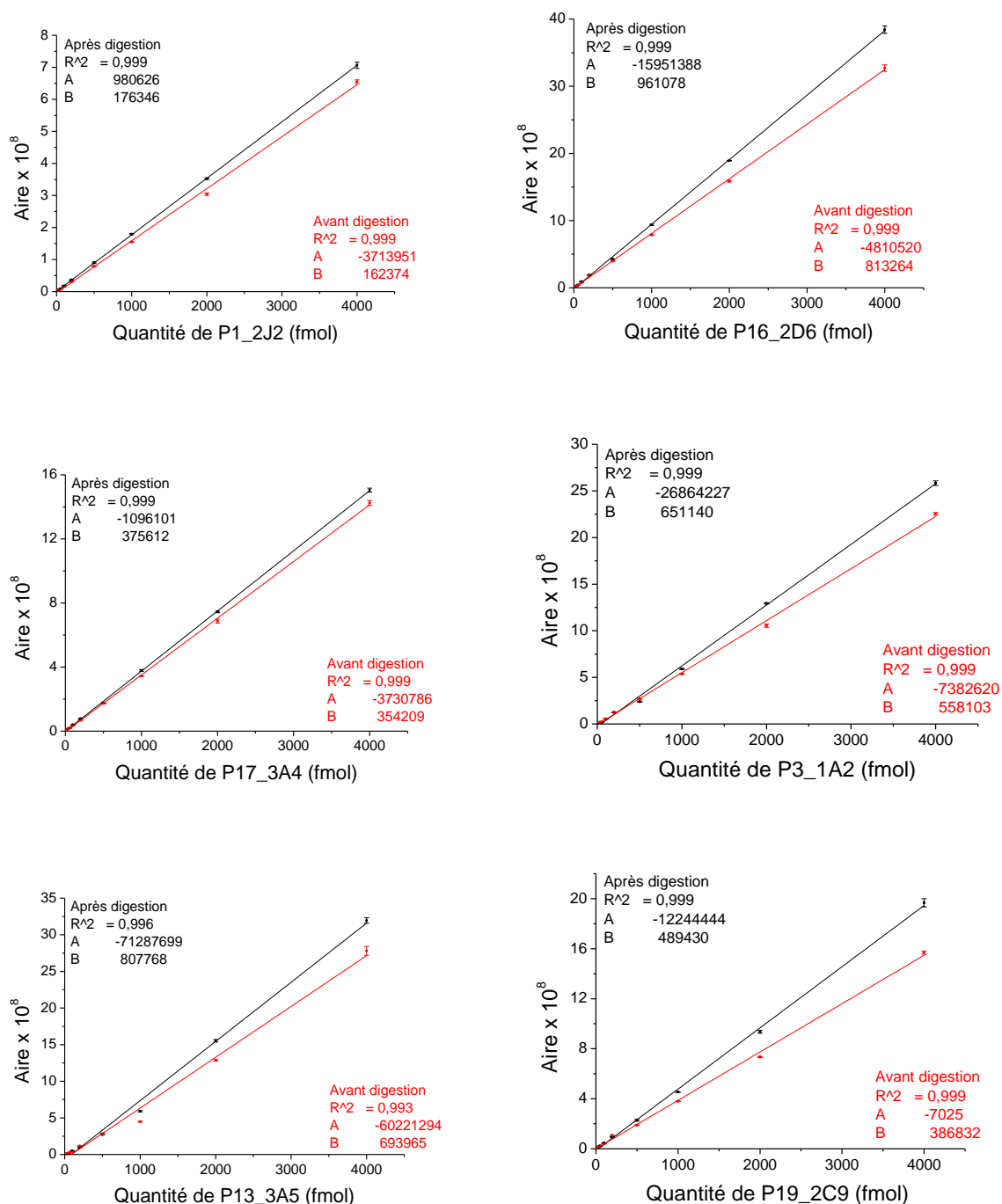


Figure (15) Courbes d'étalonnage des PPs ajoutés dans la matrice (Mic_HepG2) avant digestion avec cystéine (ligne rouge) et après la digestion (ligne noire).

Dans la littérature relative à la quantification, la protection des peptides trypsiques contre la sur-alkylation par l'iodoacétamide n'est pas clairement décrite et elle n'a pas été abordée dans les articles portant sur la quantification des CYPs. Pourtant, la cystéine a été utilisée afin de

neutraliser l'iodoacétamide libre dans une étude protéomique (Violette *et al.*, 2012). Le 2,2'-thiodiethanol a aussi été proposé afin de neutraliser l'IAA libre en excès (Boja and Fales, 2001).

1.6.2 Problème de compatibilité des flacons en polypropylène avec la chaîne Accela

La gamme de P1_2J2 dans la matrice (microsome de foie) a été préparée 2 fois, l'une en utilisant des flacons en polypropylène Dionex 250 µL adaptés aux petits volumes. Les CV sont très élevés dans ce cas alors qu'ils sont tout à fait acceptables en utilisant des flacons en verre muni d'insert de la marque Waters. (Tableau 9).

Tableau (9) Effet des flacons utilisés sur la répétabilité de l'analyse. Les valeurs représentent le CV de trois injections pour chaque concentration.

famol injectés	Polypropylène	Insert
50	19,7	2,2
100	37,0	1,8
200	34,3	1,0
500	106,9	1,6
1000	7,6	1,5

1.6.3 Problèmes rencontrés au niveau de l'acquisition

Pour la quantification et afin de définir un pic chromatographique, il faut disposer d'au moins 12 points. Le temps de scan et la largeur de la fenêtre de scan ont été optimisés afin d'obtenir 12 points pour chaque pic chromatographique. La largeur de la fenêtre de scan a été fixée à 1 Da afin d'obtenir une meilleure sensibilité au détriment de la sélectivité.

La pression de gaz de collision a été aussi optimisée pour une meilleure sensibilité et répétabilité.

Les valeurs 0,133- 0,16 et 0,2 Pa ont été testées. La valeur de 0,2 Pa donne le meilleur rapport intensité / linéarité et a été choisie (Tableau 10).

Tableau (10) Optimisation de de la pression du gaz de collision.

Pression Pa	P1_2J2		P3_1A2	
	Intensité	CV%	Intensité	CV%
0,133	9,7E+06	3,6	3,1E+07	2,1
0,16	1,1E+07	4,1	3,2E+07	0,8
0,2	1,2E+07	0,8	3,9E+07	0,7

1.6.4 Problème de collage (adsorption) de certains peptides

La quantification des peptides par spectrométrie de masse est fondée sur la mesure de l'intensité de signal du peptide. Cette intensité doit être linéaire en fonction d'une quantité injectée croissante. Cette relation linéaire peut être altérée par plusieurs facteurs. Chaque peptide a des propriétés physico-chimiques (liées aux acides aminés composant ce peptide) qui peuvent poser des problèmes analytiques notamment au niveau de la séparation chromatographique. L'un de ces problèmes est l'hydrophobicité du peptide et son adsorption sur les matériels utilisés pour la séparation chromatographique comme les vials, les tuyaux et la colonne analytique.

Les peptides P13_3A5, P15_3A4 et P5_2D6 sont très hydrophobes. L'index GRAVY (grand average of hydropathicity) (La valeur de GRAVY est définie par la somme des valeurs d'hydropathie de tous les acides aminés, divisée par la longueur du peptide) est -0,1375, 0,4875 et -0,2357, respectivement (<http://web.expasy.org/protparam>). Une gamme d'étalonnage dans l'eau ne peut pas être préparée pour des quantités inférieures à 500 fmol à cause de ces phénomènes d'adsorption. En cas d'ajout des peptides dans la matrice, la LOD descend à 50 fmol pour P13_3A5. Par contre P15_3A4 et P5_2D6 ne sont détectés qu'à partir de 200 fmol. Afin de régler ce problème de collage, deux solutions ont été proposées :

- Diluer les peptides standards dans un détergent (le cholate de sodium) pour préparer les gammes, une nette amélioration pour le peptide P13_3A5 est observée. L'intensité de P15_3A4 et P5_2D6 est améliorée mais la LOD reste à 200fmol et la linéarité est mauvaise (Figure 16).

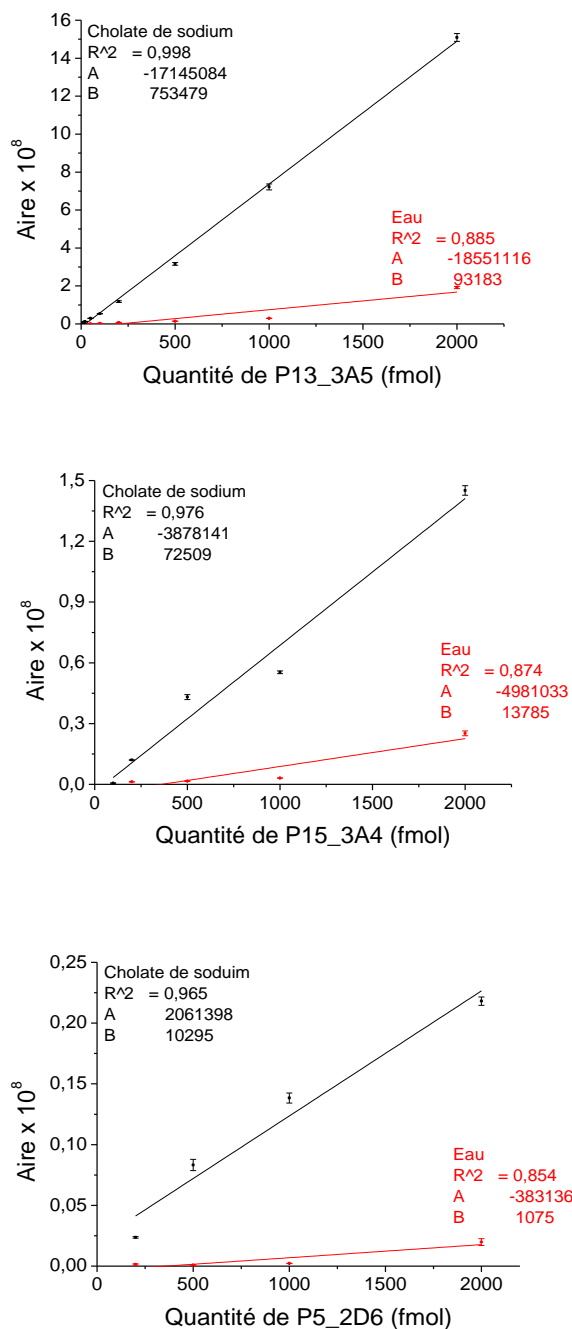


Figure (16) Effet de l'utilisation de cholate de sodium sur l'adsorption des peptides hydrophobes.

- Les peptides ont aussi été dilués dans une solution d'ACN 20%. Un effet comparable au cholate est observé pour le P13_3A5. Aucune amélioration n'a été remarquée sur la linéarité de P15_3A4 et P5_2D6 donc d'autres peptides protéotypiques ont été choisis pour représenter les CYPs 3A4 et 2D6.
- Le fait d'ajouter les peptides P15_3A4 et P5_2D6 après la digestion a été testé mais sans aucune amélioration de la linéarité.

- Des inserts désactivés (Waters et Agilent) ainsi que des vials en polypropylène (Waters) ont été testés mais sans aucune amélioration de la linéarité n'a été constaté.

L'effet de hydrophobicité des peptides sur leur détection par MS a été discuté récemment (Warwood *et al.*, 2013). Les auteurs ont proposé l'ajout de 5% d'ACN afin d'améliorer la linéarité et la répétabilité des signaux formés par les peptides hydrophobes. Nous avons utilisé une solution d'eau/ACN/AF (95/5/1) afin de reprendre les échantillons avant l'analyse. Pour les peptides P15_3A4 et P5_2D6, nous avons utilisé un pourcentage d'ACN jusqu'à 20% sans observer d'amélioration.

Suite à ces résultats, d'autres peptides protéotypiques pour les CYPs 3A4 et 2D6 ont été testés.

1.7 Détermination de la quantité de protéines injectées*

Certaines isoformes comme les CYPs 2J2 et 3A5 sont moins abondantes dans le foie, donc le fait d'injecter une quantité importante de protéines peut aider à améliorer la performance de la méthode en augmentant la quantité de cible pour qu'elle soit supérieure à la LOQ. Le signal des peptides (intensité et aire de pic) dans les microsomes et mitochondries de foie a été évalué en fonction de la quantité de protéines injectées (5, 10 et 20 µg) (Tableau 11).

Tableau (11) Ratio d'aire de pic entre 10 et 5 puis entre 20 et 10 µg de protéines microsomaux ou mitochondriales injectées.

CYP	Ratio d'aire de pic (microsomes)		Ratio d'aire de pic (mitochondrie)	
	10/5 µg	20/10 µg	10/5 µg	20/10 µg
CYP2J2	2,7	2,3	2,6	2,2
CYP2D6	2,2	1,9	2	1,7
CYP3A4	2,2	1,8	2,1	1,9
CYP1A2	2,4	2	2,1	1,8
CYP3A5	2,6	2,1	2,2	1,9
CYP2C9	2,3	2	2,1	1,7

Aucune suppression de signal n'a pas été remarquée en injectant plus de protéines.

La même évaluation a été faite pour les gammes d'étalonnage. Une gamme de 25 à 4000 fmol a été préparée sur la base de 5 ou 20 µg de protéines de matrice (Mic_HepG2) injectées (Figure 17). Une suppression de signal a été remarquée en injectant plus de protéines notamment pour P3_1A2 et P19_2C9.

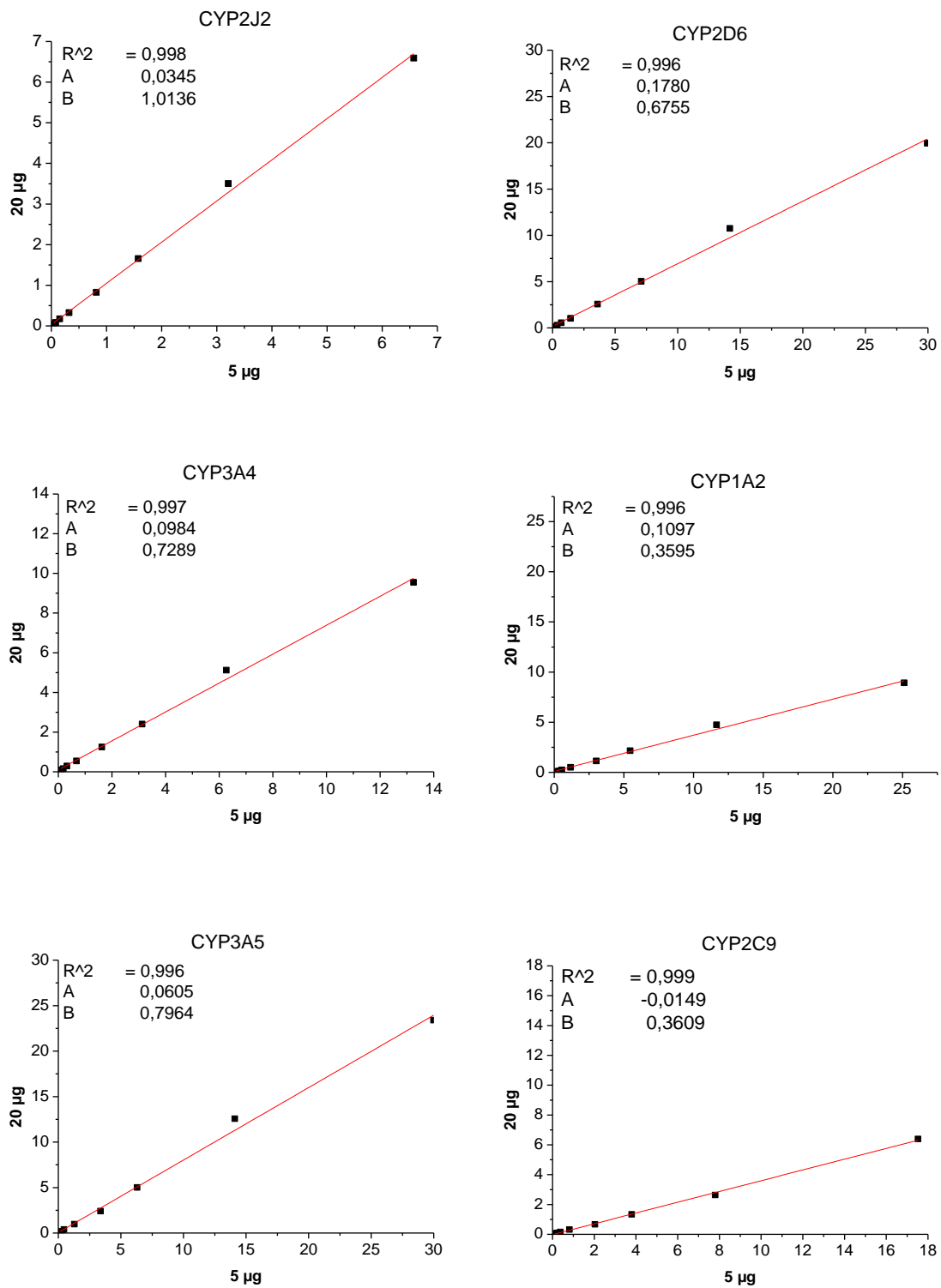


Figure (17) Comparaison des deux gammes, 5 (en abscisse) et 20 (en ordonnée) µg protéines injectées.

Suite à ces résultats, la quantification des CYPs dans les échantillons de foie humain a été réalisée avec une gamme d'étalonnage préparée pour 5 µg de protéines injectées. Pour les

échantillons à quantifier, une quantité injectée de 20 µg de protéine microsomale ou mitochondriale a été utilisée. D'autre part, pour les échantillons à quantifier (HepG2_CYP et baculosomes), une quantité de 5 µg de protéine est utilisée pour la gamme et les échantillons.

1.8 Gammes d'étalonnage réalisées dans différentes matrices

Les gammes d'étalonnage externes sont en général préparées dans des matrices proches de l'échantillon à analyser. Duan *et al.* ont utilisé des microsomes de rat comme matrice afin de préparer une gamme d'étalonnage pour quantifier 5 rCYP dans des baculosomes (Duan *et al.*, 2007a). Wang *et al.* ont préparé deux gammes d'étalonnage externes, l'une en utilisant un mélange de peptides standards non marqués dans une matrice proche (matrice non décrite dans la publication) des échantillons et l'autre des rCYP dans des baculosomes. Les deux gammes ont été dopées par un étalon interne marqué (Wang *et al.*, 2008).

Récemment, deux études AQUA ont été réalisées en utilisant la BSA ou l'albumine de sérum humain (HSA) comme matrice pour préparer les gammes d'étalonnage afin de quantifier des protéines de phase II (UGT1A1 et UGT2B7) (Sato *et al.*, 2012b) et des protéines de phase III (MRP2 et ABCC2) (Deo *et al.*, 2012) dans le foie humain.

Alterman *et al.* ont réalisé une quantification (sans marquage) en préparant des gammes d'étalonnage externe par des PPs non marqués et en utilisant un autre peptide non marqué comme étalon interne (Alterman *et al.*, 2005).

Nous nous sommes intéressés à quantifier les CYPs dans différents échantillons biologiques, il faut donc évaluer la linéarité et les LOQ dans les différentes matrices.

Des quantités de 12,5 jusqu'à 2000 fmol injectées ont été testées selon les matrices suivantes : d'une part microsomes et homogénat total (HT) provenant des cellules HepG2 et d'autre part de baculosomes. (Tableau 12). En regardant la pente B, l'effet de matrice est comparable sauf pour P3_1A2 dans le baculosome où une suppression de signal est remarquée.

Tableau (12) Comparaison des droites d'étalonnage $Y = B \times X + A$ des 6 PP dans différentes matrices.

CYPs	Matrice	Gamme (fmol)	A	B	R^2	CV%
P1_2J2	Mic_HepG2	12,5 - 2000	0,00079	0,00174	0,999	1,4 - 3,7
	HT_HepG2	12,5 - 2000	0,01287	0,00143	0,999	1,3 - 5
	baculosome	50 - 2000	0,01500	0,00125	0,999	1 - 4,7
P16_2D6	Mic_HepG2	25 - 2000	0,02983	0,00733	0,999	2 - 7,8
	HT_HepG2	25 - 2000	0,06492	0,00668	0,999	0,5 - 5
	baculosome	50 - 2000	0,01833	0,00545	0,999	0,5 - 6
P17_3A4	Mic_HepG2	25 - 2000	0,02146	0,00343	0,999	1,2 - 9,8
	HT_HepG2	25 - 2000	0,03642	0,00308	0,999	0,4 - 4,8
	baculosome	50 - 2000	0,00517	0,00222	0,999	0,5 - 7,5
P3_1A2	Mic_HepG2	25 - 2000	0,00496	0,00501	0,999	3,2 - 5,4
	HT_HepG2	25 - 2000	- 0,00225	0,00588	0,999	1,5 - 4,7
	baculosome	50 - 2000	- 0,04474	0,00214	0,993	0,5 - 6,6
P13_3A5	Mic_HepG2	25 - 2000	- 0,06479	0,00552	0,997	1,6 - 10,4
	HT_HepG2	25 - 2000	- 0,12855	0,00621	0,998	1,2 - 9,4
	baculosome	50 - 2000	- 0,27165	0,00527	0,991	0,4 - 3,6
P19_2C9	Mic_HepG2	25 - 2000	0,01058	0,00408	0,999	2,6 - 5,7
	HT_HepG2	25 - 2000	0,04156	0,00399	0,999	2,1 - 7,5
	baculosome	50 - 2000	- 0,01234	0,00301	0,998	0,8 - 2,8

1.9 Validation de la méthode

Afin de valider la méthode de dosage dans le foie et les autres échantillons, des échantillons contrôle qualité (QC) et des tests d'exactitude et de précision ont été réalisés en respectant les recommandations du guide de validation

(http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)

Trois niveaux de QC, bas, moyen et haut de la gamme ont été mis en place avec analyse en triplicat tous les 15 échantillons (24h) (Tableau 13). L'erreur relative dans les valeurs haute et moyenne de QC doit être inférieure à 15% tandis que dans les valeurs basses, l'erreur relative est inférieure à 20%. Le coefficient de variation pour toutes les valeurs de QC est inférieur à 6%.

Tableau (13) Inexactitude et CV des échantillons de contrôle qualité QC.

CYP	Erreur relative			Precision (CV%)		
	LQC 75	MQC 500	HQC 1500	LQC 75	MQC 500	HQC 1500
CYP2J2	-4	-1	1	2	1,8	1,6
CYP2D6	-15	-10	-6	1,9	1,1	1,7
CYP3A4	-10	-7	-4	1,7	2,9	2,4
CYP1A2	-11	-6	-1	3,2	2,8	2,4
CYP3A5	-16	1	-9	4,2	1,7	2,5
CYP2C9	-15	-12	-10	2,6	2,7	2,5

Chaque point de données représente la moyenne de trois échantillons analysés à trois jours différents

L'erreur relative (Inaccuracy) = (quantité mesurée - quantité théorique) / quantité théorique × 100

CV% = (écart type de quantité mesurée / la moyenne de quantité mesurée) × 100

L'analyse des 50 foies humains a été réalisée en deux groupes de 25. Pour chaque groupe, l'analyse a duré 3 jours. Les échantillons sont restés au maximum 24h sur le passeur et 48h dans le congélateur à -80°C. Des tests de stabilité de ces conditions ont été réalisés (Tableau 14)

Tableau (14) Stabilité des peptides dans le foie et dans les points QC sur le passeur à 4°C pendant 24h, stabilité dans le foie à -80°C pendant 48h.

CYP	Différence par rapport à la quantité initiale %						
	-80°C (48h)		4°C (24h)				
	Mic	Mito	Mic	Mito	LQC 75	MQC 500	HQC 1500
CYP 2J2	1.5	-2.1	1,4	-1,1	-1,6	2,2	3,3
CYP 2D6	-3	-1,5	-5,8	-0,9	-5,8	3,4	5,9
CYP 3A4	2,1	-2.3	-4,8	1,8	-7,6	1,2	6
CYP1A2	-4.1	1,2	-3,5	-3,1	-4	2,8	4,7
CYP3A5	-1,4	-3,2	-2,2	-0,7	2,2	2,9	5,9
CYP 2C9	2,3	-0.8	-3,1	-1,1	-1,8	1,8	5,2

La différence de la quantité initiale % = (quantité après le stockage – quantité initiale) / quantité initiale.

L'effet de matrice a aussi été évalué en ajoutant une quantité de 1000 fmol dans un échantillon de microsome de foie. La quantité initiale des CYPs dans l'échantillon et la quantité trouvée après avoir ajouté les 1000 fmol ont été mesurées. Ensuite, l'erreur relative a été calculée

(Tableau 15). Les valeurs d'erreur relative sont inférieures de 20% sauf pour le P13_3A5 (25,7%).

Tableau (15) Effet de la matrice.

CYP	Quantité échantillon (fmol/20µg)	Quantité ajoutée (fmol)	Quantité trouvée (fmol)	Quantité calculée (fmol)	Erreur relative %
CYP2J2	123,0	1000	1 146,2	1 023,2	2,3
CYP2D6	73,0	1000	909,1	836,1	-16,4
CYP3A4	1 459,4	1000	2 285,6	826,3	-17,4
CYP1A2	1 244,5	1000	2 398,1	1 153,6	15,4
CYP3A5	147,6	1000	890,8	743,2	-25,7
CYP2C9	2 515,4	1000	3 349,2	833,8	-16,6

Une quantité de 1000 fmol a été ajoutée dans un échantillon de microsomes de foie dont les quantités initiales de 6 CYPs sont mesurées. L'erreur relative = (quantité calculée - quantité initiale) / quantité initiale × 100.

1.10 Quantification des CYPs dans les cellules HepG2

Des lignées cellulaires hépatiques avec des capacités de catalyse de certains xénobiotiques ont été développées dans notre laboratoire (INSERM UMR-S1147). Pour cela, des cellules HepG2 ont été transfectées avec des lentivirus recombinants, qui exprimaient soit uniquement la GFP (green fluorescent protein) qui sert à vérifier le taux d'infection des cellules, soit la GFP et un CYP. Nous avons donc obtenu des lignées cellulaires exprimant de manière stable un CYP. Le but de cette application est de caractériser ces nouvelles lignées. Nous nous sommes intéressés aux quantités de CYP produites par les cellules et à leurs activités catalytiques. L'intérêt étant de pouvoir comparer les lignées cellulaires développées avec des cellules de foie humain afin de savoir si nos lignées sont des modèles proches des conditions dans les cellules de foie humain.

Tableau (16) Quantité de CYP en pmol/mg de microsomes mesurée par MS dans HepG2.

Échantillon	CYP2D6	CYP3A4	CYP1A2	CYP3A5	CYP2C9
HepG2_GFP	0	0	0	0	0
HepG2_GFP_CYP	82 (2)	38 (0,5)	5,5 (0,3)	18,5 (0,1)	22 (0,2)

L'expression de CYP dans ces lignées cellulaires HepG2 est largement suffisante afin de permettre l'étude de la production de métabolites et des effets pharmacologiques ou toxicologiques.

1.11 Quantification des CYPs dans les baculosomes

La quantité de CYP surexprimée dans les baculosomes commerciaux est mesurée par spectrophotométrie. Ces données spectrales reflètent la quantité d'holoprotéine, c'est-à-dire l'hème lié à l'apoprotéine. Or le taux d'incorporation de l'hème dans l'apoprotéine est variable.

La quantité de protéines dans les baculosomes a été déterminée par MS et une augmentation d'un facteur 2 à 6 a été trouvée (Tableau 17).

Tableau (17) Quantité de CYP en pmol/mg mesurée par le spectre CO et par MS.

CYP	CYPs concentrations nmol/mg (SD)		
	MRM méthode	Spectrophotométrie méthode	Holoprotéine/apoprotéine %
CYP3A4	1,33 (0,04)	0,95	71
CYP3A5	0,86 (0,03)	0,41	48
CYP2D6	0,48 (0,01)	0,11	23
CYP2C9	1,45 (0,01)	0,56	39
CYP1A2	0,63 (0,02)	0,11	18

Une grande variabilité dans les niveaux d'holoprotéine (en pourcentage de l'apoprotéine totale) a été reportée dans la littérature : 3,16 à 35,5% pour CYP 2D6 (supersomes) (Yu *et al.*, 2009), 59% pour CYP3A4 (supersomes) (Wang *et al.*, 2008), entre 45 et 88% pour les CYPs 1A2, 2E1 and 2C19 (protéine purifiée) (Alterman *et al.*, 2005).

1.12 Dosage du CYP2U1 dans des lignées cellulaires neuronales humaines SH SY-5Y*

1.12.1 Introduction (importance du CYP2U1)

Certains CYPs sont exprimés en faible quantité dans certains organes comme par exemple le CYP2U1 dans le cerveau humain. Dans le cerveau humain, les CYPs représentent environ 0,5 à 2 % par rapport à la quantité des CYPs dans le foie (Ferguson and Tyndale, 2011). Ils jouent un rôle important dans l'homéostasie cérébrale en plus de leur rôle dans le métabolisme des xénobiotiques. Le CYP2U1 est une nouvelle isoforme extra-hépatique fortement exprimée dans le cerveau et le thymus (Karlgrén *et al.*, 2004). Il a été détecté au niveau protéique par WB et par coloration immuno-cytochimique (immunocytochemical staining) dans le cerveau humain notamment dans les microsomes et les mitochondries du lobe frontal (Dutheil *et al.*, 2009). Le CYP2U1 métabolise l'acide arachidonique, l'acide docosahexaénoïque (DHA) et d'autres acides gras à longue chaîne (Chuang *et al.*, 2004). Le CYP2U1 catalyse, en particulier, l'hydroxylation de l'acide arachidonique en deux métabolites, les acides 19- et 20-hydroxyeicosatétraénoïque (HETE), dont les fonctions physiologiques sont d'une importance majeure (e.g. le 20-HETE est un vasoconstricteur puissant dans les reins et le cerveau). Le CYP2U1 est surexprimé dans de nombreuses tumeurs (e.g. cancer primitif du côlon et cancer de l'ovaire) (Downie *et al.*, 2005; Kumarakulasingham *et al.*, 2005).

Afin de pouvoir quantifier les isoformes de faible abondance, il est nécessaire de développer une méthode sensible et reproductible. Le couplage nano-LC-ESI permet d'atteindre une haute sensibilité (jusqu'à 10 amol de peptides injectés) en utilisant des colonnes analytiques adaptées (Ivanov *et al.*, 2003).

1.12.2 Préparation des échantillons biologiques

Les préparations ont été effectuées à partir de cortex frontal (F2) de patients atteints de SLA (sclérose latérale amyotrophique). Les échantillons ont été broyés et homogénéisés dans un tampon hypertonique (0,32 M saccharose, 50 mM KH_2PO_4 , EDTA 1 mM, DTT 0,1 mM) ajusté à pH 7,4, puis centrifugés 10 min à 800 g, pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite les surnageants ont été récupérés et centrifugés 20 minutes à 10000 g pour récupérer les mitochondries. Le surnageant (S9) a été récupéré. Une petite partie a été prélevée et le reste a été ultracentrifugé 1 h à 100000 g. Les culots contenant les microsomes ont été resuspendus dans 150 μL d'un tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 7,4). Les microsomes, mitochondries et S9 de lignée SH-SY5Y (SH) ont été préparés de la même manière.

Les échantillons (microsomes, mitochondries et S9) ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

1.12.3 Résultats

1.12.3.1 Optimisation du couplage nano-LC-TSQ avantage

L'analyse a été effectuée avec un système nano-HPLC Dionex Ultimate 3000 couplé au TSQ avantage (Thermo Fisher Scientific) équipé d'une source nanoelectrospray. Les échantillons ont été chargés sur une précolonne (0,3 mm × 5 mm, 5 µm) puis séparés en utilisant une colonne C18 PepMap™ (0,075 × 150 mm, 5 µm). Les phases mobiles étaient A (eau, 0,1% FA) et B (ACN). Le gradient utilisé est présenté dans le tableau (18).

Tableau (18). Gradient utilisé en nano-HPLC.

Temps (min)	A%	B%	Débit nL/min
0	98	2	300
40	40	60	300
42	0	100	300
47	0	100	300
48	98	2	300
60	98	2	300

L'optimisation a été réalisée en trois étapes :

1) La Leucine-Enkephaline (YGGFL) (LeuEnk) a été utilisée dans une étude préliminaire afin d'optimiser le couplage nano-LC-TQ. Une méthode MRM a donc été créée pour la LeuEnk, P8_2U1 et P9_2U1 (Voir la section 1.1.2 pour la sélection des PPs) (Tableau 19).

Tableau (19) Méthode MRM optimisée pour la LeuEnk et les PPs du CYP2U1.

Peptide	<i>m/z</i> précurseur	Type de fragment	<i>m/z</i> fragment	Temps de scan (ms)	Energie de collision (eV)
LeuEnk* YGGFL	[M+H] ²⁺ 556,26	a ₄ ⁺	397,24	40	20
		b ₃ ⁺	278,1	40	24
		F ⁺	120,16	40	38
		b ₄ ⁺	425,25	40	15
P8_2U1 FLDDQGQLIK	[M+2H] ²⁺ 588,8	y ₉ ⁺	1030,38	100	16
		y ₈ ⁺	916,6	100	16
		y ₇ ⁺	801,57	100	17
		y ₆ ⁺	686,61	100	15
P9_2U1 FDYTNSEFK	[M+2H] ²⁺ 575,8	y ₈ ⁺	1003,86	100	15
		y ₇ ⁺	888,67	100	15
		y ₆ ⁺	725,35	100	16
		y ₅ ⁺	625,32	100	18

Résolution Q1, Q3=0,7, Largeur de scan=1Da, pression de gaz de collision est 0,14 Pa. * LeuEnk est utilisé pour optimiser le couplage nano-LC-TQ

2) Afin de vérifier la linéarité de la méthode, un mélange de 50 fmol de peptides standards (P8_2U1 et P9_2U1) est utilisé pour préparer une gamme en solvant (H₂O/ACN/AF (94/5/1 v/v/v)) de 0,1 à 15 fmol injectés. Les coefficients de corrélation sont 0,984 et 0,986 pour P8_2U1 et P9_2U1, respectivement. Pour une gamme restreinte de 0,1 à 4 fmol, les coefficients de corrélation sont meilleurs, 0,999 et 0,996 pour P8_2U1 et P9_2U1, respectivement. Le coefficient de variation est 1,2-6% pour l'ensemble de la gamme et 23,8% à LOQ (0,1 fmol) pour P8_2U1 et 0,6-4 pour l'ensemble de la gamme et 28% à LOQ (0,1 fmol) et P9_2U1 (Figure 18).

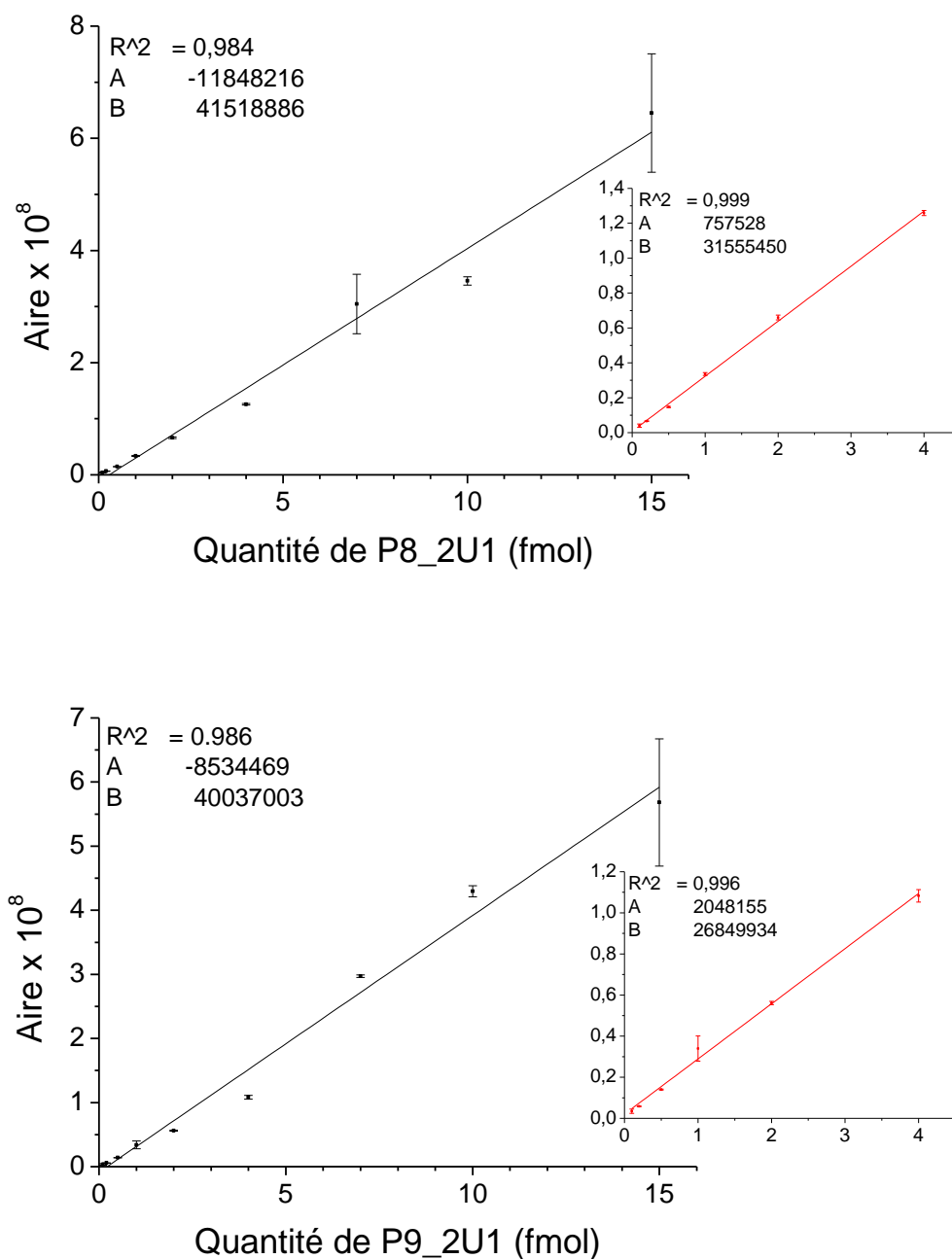


Figure (18) Gamme d'étalonnage pour les standards P8_2U1 et P9_2U1.

3) La linéarité de la méthode nano-LC a aussi été vérifiée pour les échantillons. La lignée cellulaire SH transfectée par des quantités différentes de 20, 50 et 100 MOI, surexprimant le CYP2U1, a été produite par notre équipe au laboratoire INSERM UMR-S1147. 0,1 µg de protéine provenant de la digestion trypsique des S9 (cytosol + microsomes) ont été analysés (Figure 19). La méthode est capable de détecter des quantités croissantes du CYP2U1 (une réponse linéaire pour P8_2U1 et P9_2U1 a été observée en fonction de l'expression qui dépend ici du degré de la transfection).

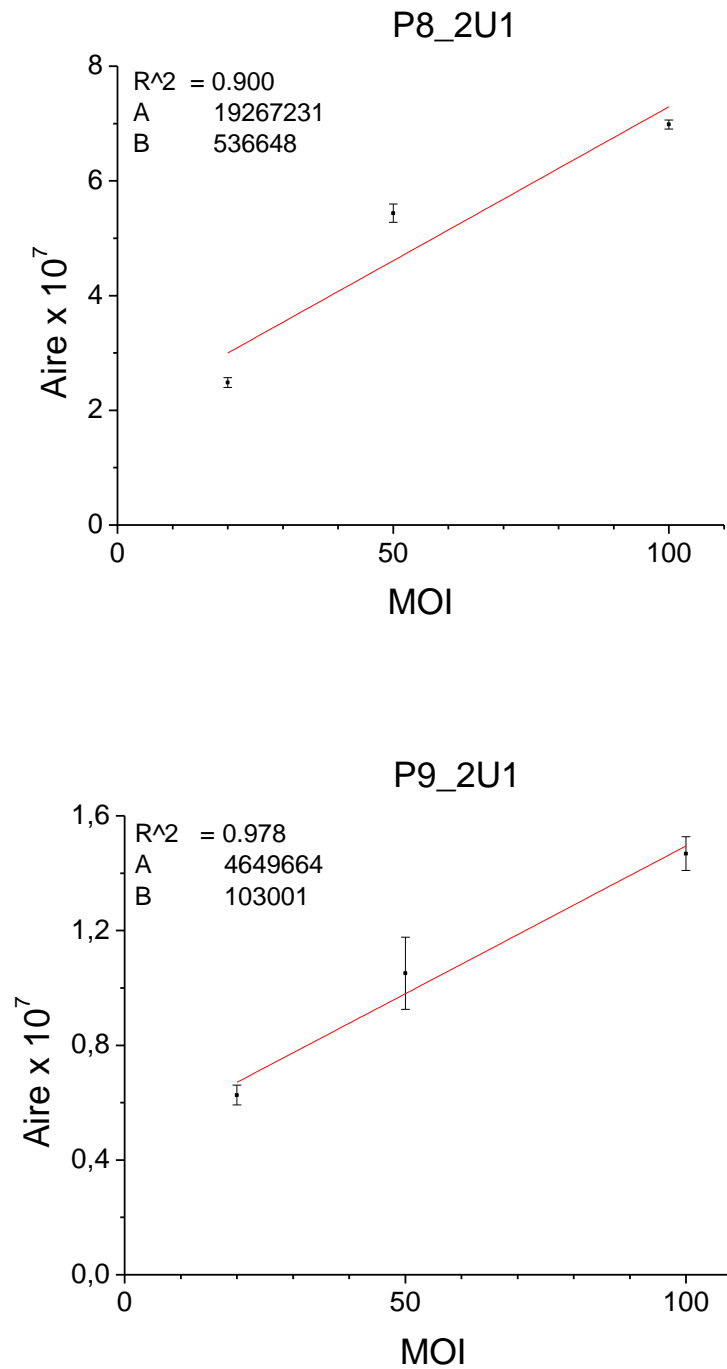


Figure (19) Linéarité de la méthode nano-LC dans la lignée SH_2U1 pour P8_2U1 et P9_2U1.

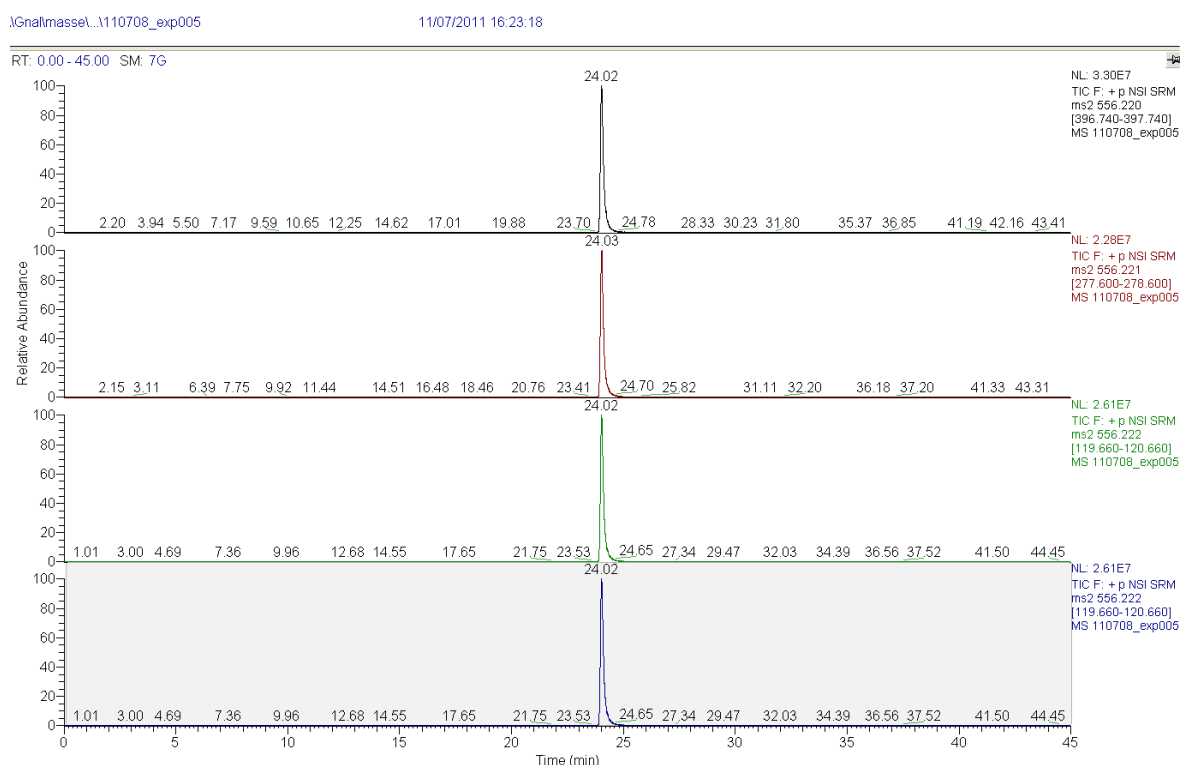
Notre méthode montre une très bonne linéarité et peut être appliquée pour quantifier le CYP2U1 dans la matrice biologique.

1.12.3.2 Problèmes expérimentaux

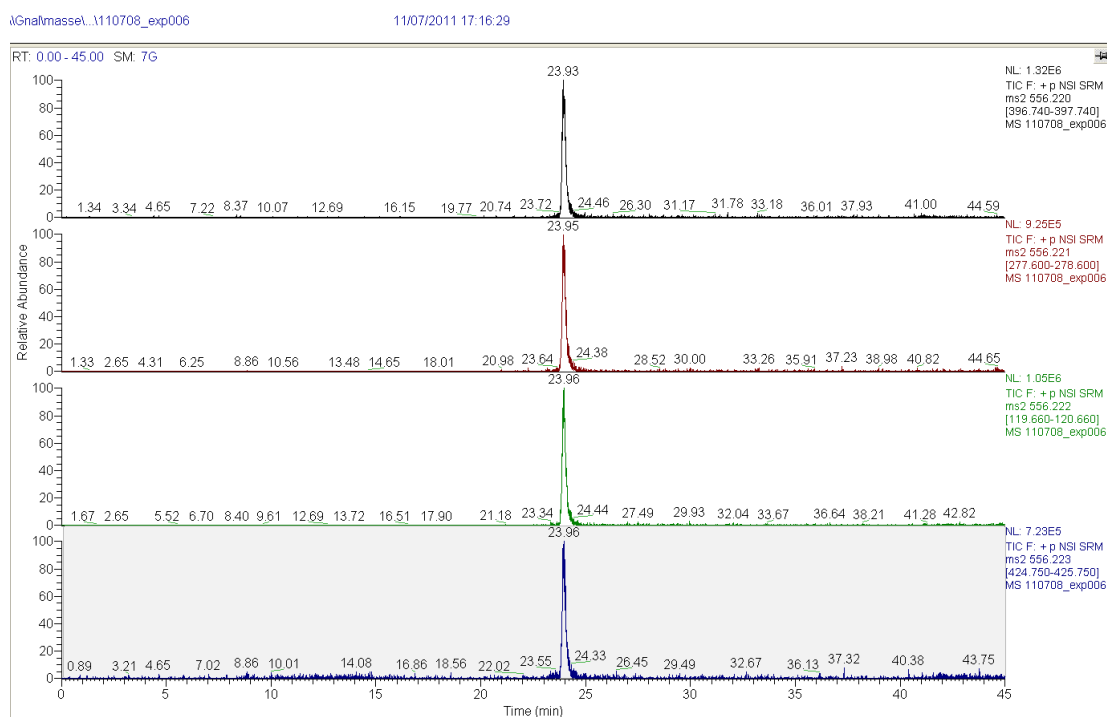
1.12.3.2.1 Effet de mémoire (Carry over)

Un problème d'effet de mémoire (carry over) est observé dans les blancs. L'effet de mémoire en nano-LC est connu et varie selon les peptides et les colonnes analytiques utilisées (Dolman *et al.*, 2013). Après avoir injecté 30 fmol de LeuEnk sur la colonne, un effet de mémoire correspondant à 5% du signal est observé dans le blanc suivant (Figure 20). Un effet de mémoire correspondant à 1% du signal est observé dans le troisième blanc.

a)



b)



c)

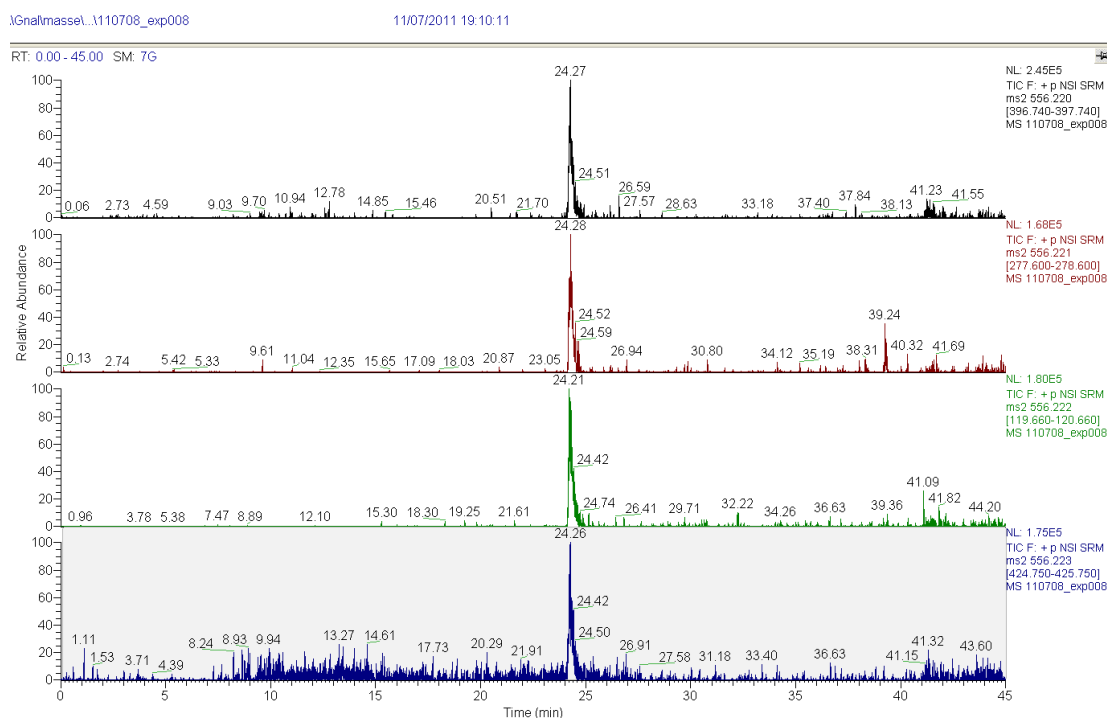


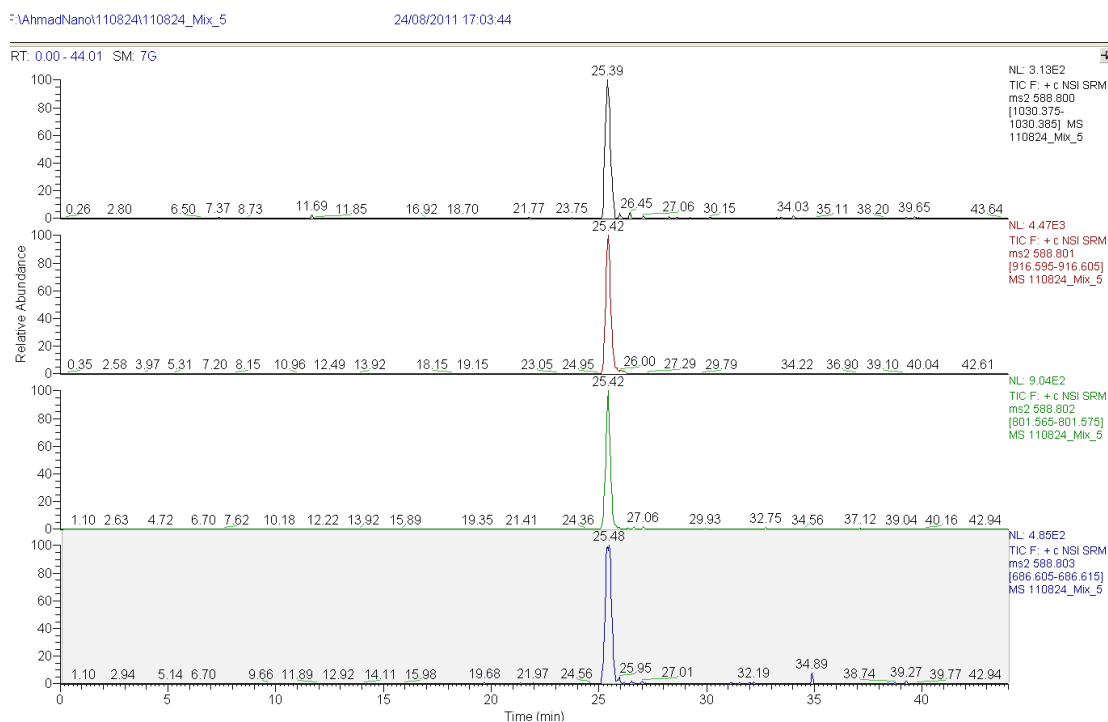
Figure (20) 30 fmol de LeuEnk injecté (a), premier blanc (b), troisième blanc (c). Les sommes des aires de pic sont $1046,3 \times 10^6$, $48,8 \times 10^6$ et $7,6 \times 10^6$, respectivement.

Afin de minimiser cet effet mémoire, plusieurs solutions ont été testées : un rinçage de l'aiguille et de la boucle d'injection avec une solution eau/isopropanol (20/80, v/v), un changement de

la précolonne et une diminution de la quantité injectée (10, 5, 1 fmol). L'effet de mémoire est toujours observé.

1 fmol de chaque PP (P8_2U1 et P9_2U1) sont injectés, et un effet mémoire correspondant à 4% du signal est observé dans le blanc suivant (Figure 21). Aucun signal n'est détecté dans le troisième blanc, il faut donc injecter 2 blancs après chaque point afin de supprimer l'effet de mémoire. Ceci augmente significativement le temps d'analyse (une injection dure 60 min, 6 à 8 points en triplicat par gamme d'étalonnage).

a)



b)

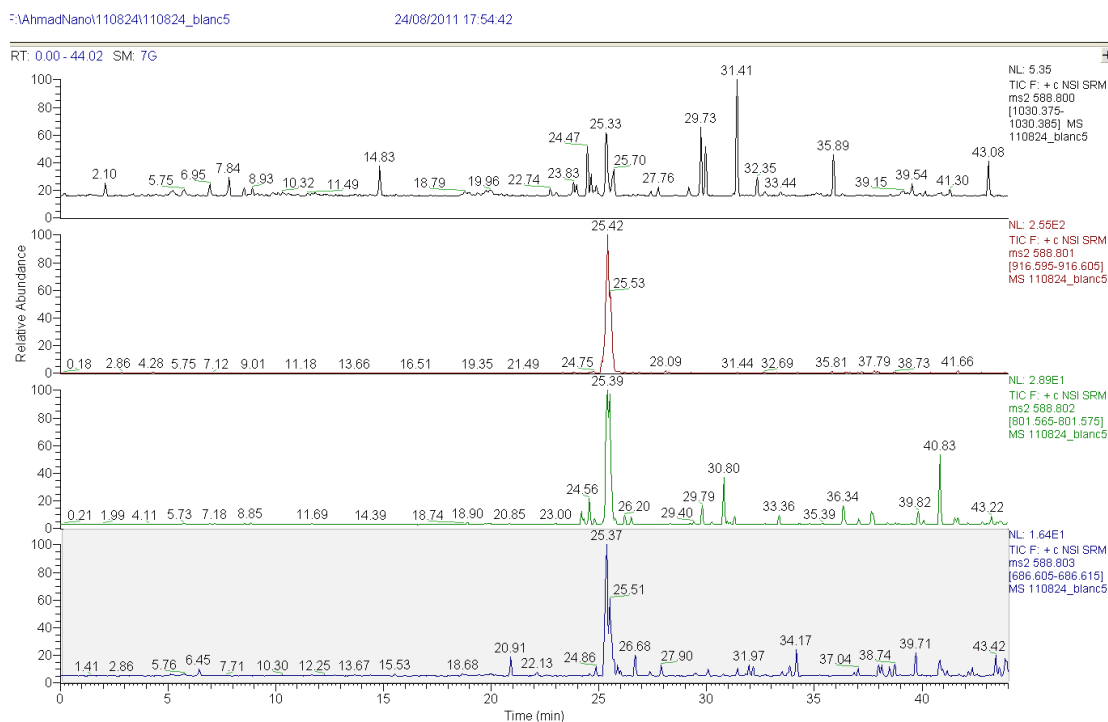


Figure (21) 1 fmol de P8_2U1 (a), premier blanc (b). Les sommes des aires de pic sont 107537 et 4485, respectivement.

La précolonne, utilisée pour la pré-concentration des échantillons dilués et le dessalage des échantillons contenant des sels incompatibles avec le spectromètre de masse, peut être une

autre origine de cet effet mémoire. L'échantillon est chargé sur la pré-colonne à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ alors que le débit utilisé pour éluer l'échantillon et rincer la pré-colonne est le même que celui utilisé pour la colonne analytique (300 nL/min). Afin d'augmenter l'efficacité du rinçage de la précolonne, un débit élevé (20 $\mu\text{L}/\text{min}$) a été utilisé pour rincer la précolonne après l'étape d'élution des peptides. Le débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ est utilisé à un temps suffisant pour rééquilibrer la précolonne avant de lancer l'injection suivante (Figure 22).

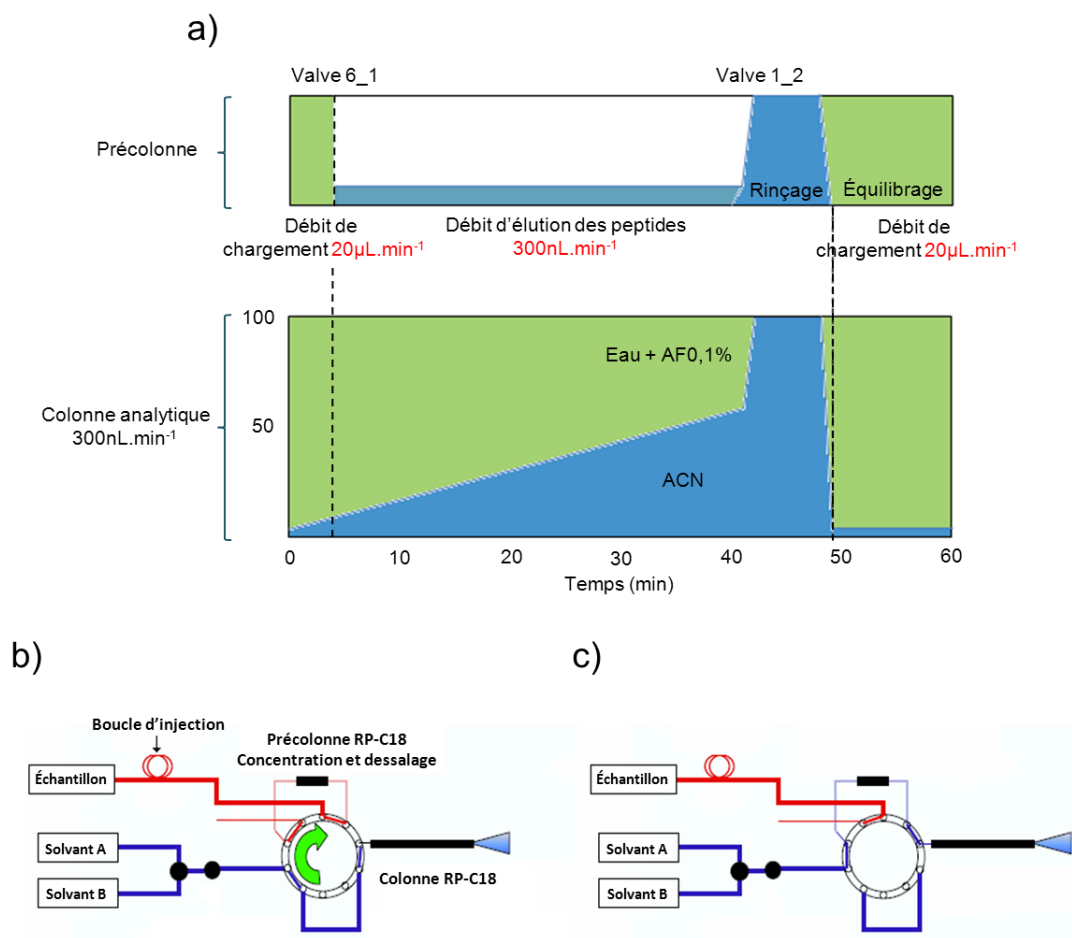
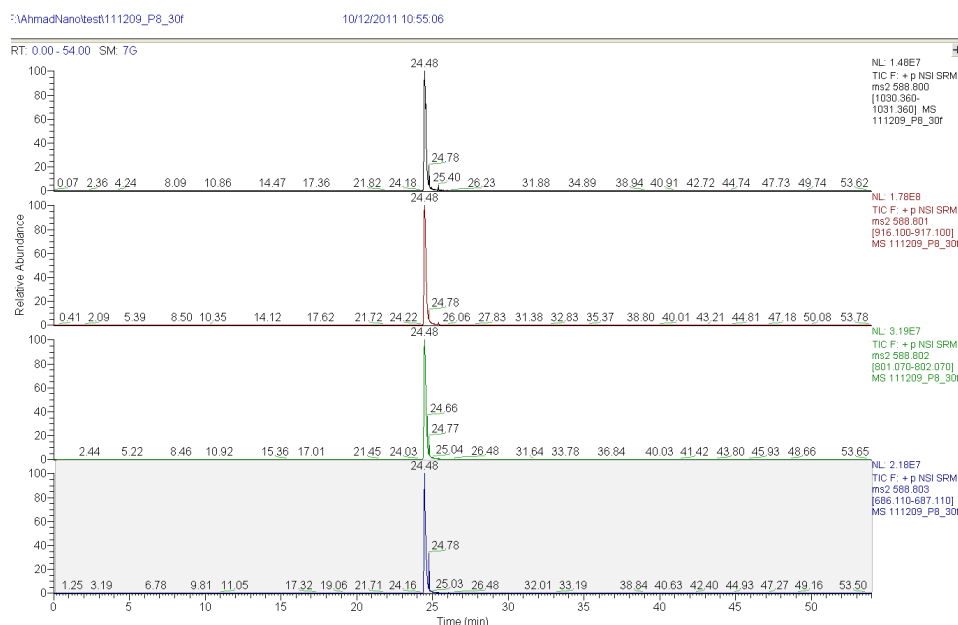


Figure (22) Méthode de rinçage appliquée sur la précolonne (a), chargement de l'échantillon sur la précolonne (b), élution des peptides de la précolonne vers la colonne analytique (c).

Cette méthode de rinçage a permis de minimiser l'effet mémoire à 0,1% de signal après l'injection de 30 fmol de peptides standard sur la colonne (Figure 23). Aucun effet de mémoire n'a été observé après l'injection des quantités entre 1 à 5 fmol.

a)



b)

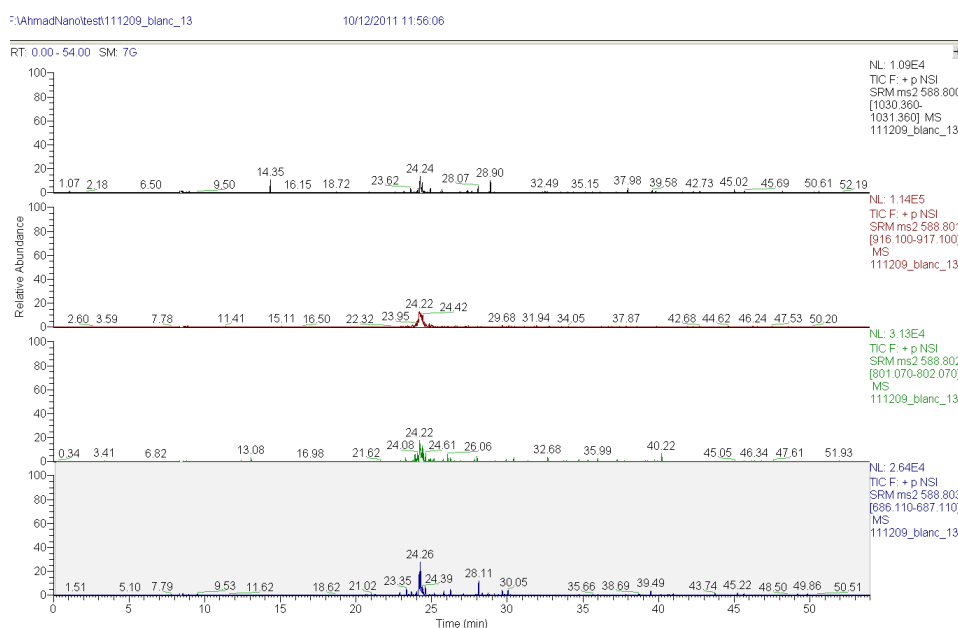


Figure (23) 30 fmol de P8_2U1 injecté (a), le blanc suivant (b). Les sommes des aires de pic sont $2440,6 \times 10^6$ et $2,75 \times 10^6$, respectivement.

1.12.3.2.1 Effet de la matrice

L'effet de matrice présente une limitation qui affecte le couplage LC-ESI (Matuszewski *et al.*, 2003; Niessen *et al.*, 2006). Les composants de la matrice co-éluee peuvent causer la suppression ou l'amélioration de la réponse de l'analyte de façon inattendue. La haute sélectivité des analyseurs ne permet pas de surmonter ce problème dans certains cas. Les différentes interactions qui sont responsables des effets de la matrice au cours de l'ionisation

en phase liquide sont difficiles à prédire et elles semblent être composé-, matrice-, méthode-, et instrument-dépendants (Matuszewski *et al.*, 2003). L'optimisation de l'étape de préparation des échantillons, les procédures de nettoyage et d'amélioration des séparations chromatographiques peuvent aider à minimiser ces effets (Antignac *et al.*, 2005).

La quantité de CYPs y compris le CYP2U1 est très faible dans le cerveau. Injecter le maximum de protéines sur la colonne pourrait augmenter la chance de détecter et quantifier le CYP2U1. Nous avons ainsi évalué l'effet de la matrice dans la matrice SH et dans les mitochondries (Tableau 20). Un effet de matrice élevé est remarqué dans la matrice SH et les mitochondries. Une suppression de signal très importante est observée.

Tableau (20) L'effet de la matrice pour le P8_2U1.

Échantillon	Quantité de protéine injectée µg	Aire x 10 ⁸	Effet de matrice %
P8_20fmol_eau	-	9,15	-
P8_20fmol_SH	2	1,81	-80
P8_20fmol_Mito	2	0,52	-94

$$\text{Effet de matrice} = (\text{Aire_eau} - \text{Aire_matrice}) / \text{Aire_eau} \times 100.$$

En effet, cet effet de matrice n'est pas gênant si le peptide naturel ciblé est détectable dans l'échantillon (cas de la lignée SH_2U1 où le CYP2U1 est surexprimé en quantité importante). Par contre, cet effet est délétère quand la quantité du CYP2U1 est très faible (cas du cerveau).

L'effet de matrice a été évalué en fonction de la quantité de protéine injectée. Des microsomes de lignée (SH) sont utilisés comme matrice blanche. La matrice a été dopée par 10 et 100 fmol de P8_2U1. 1 et 2 µg de protéine ont été injectés (tableau 21). L'effet de matrice (suppression du signal) augmente avec la quantité de protéine injectée, donc il faut injecter le moins possible.

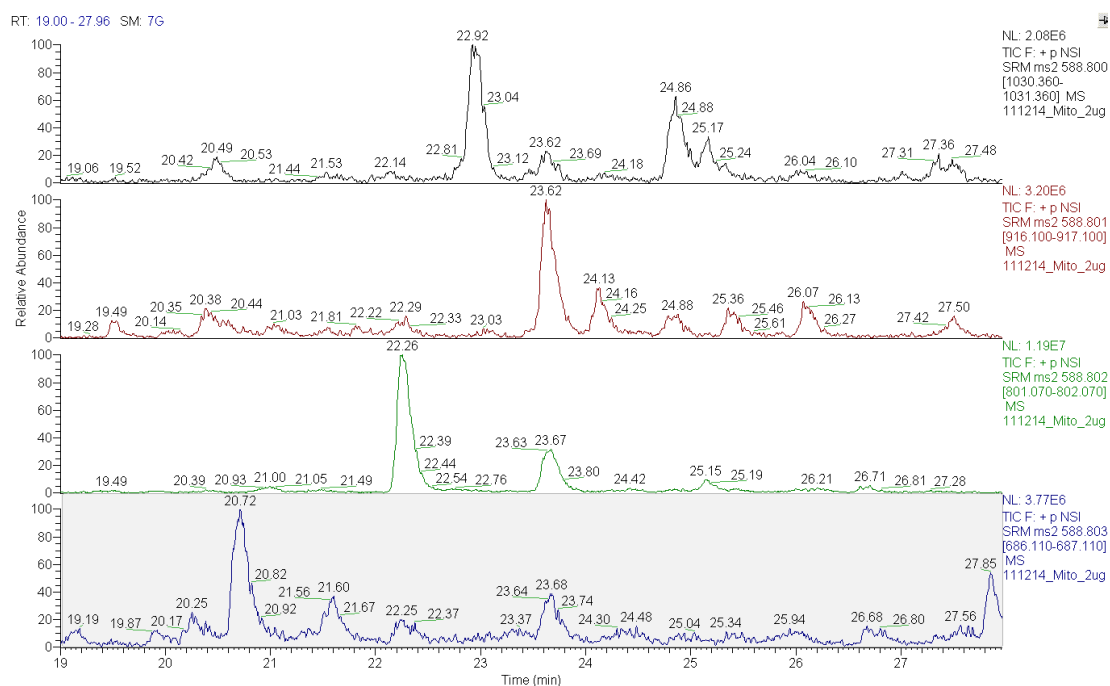
Tableau (21) L'effet de la matrice en fonction de la quantité de protéine injectée.

Échantillon	Volume injecté µL	Concentration µg/µL	Aire x 10 ⁸
P8_10fmol_SH	1	1	1,35
P8_20fmol_SH	2	1	1,56
P8_100fmol_SH	1	1	20,9
P8_200fmol_SH	2	1	22,6

1.12.3.3 CYP2U1 indétectable dans le cerveau humain

Après avoir validé la linéarité de la méthode nano-LC pour les peptides standards et avoir détecté les PPs du CYP2U1 dans les SH_2U1, des digestions de microsomes et mitochondries de cerveau humain ont été analysées afin de chercher le CYP2U1. Des quantités de 0,1, 1 et 2 µg de protéines ont été injectées sur la colonne. Le CYP2U1 n'a pas été détecté. Quatre transitions d'un interférant apparaissent à 23,6 min, confirmées en ajoutant 100 fmol de P8_2U1 dans l'échantillon dont les 4 transitions apparaissent à 24,3 min. (Figure 24).

a)



b)

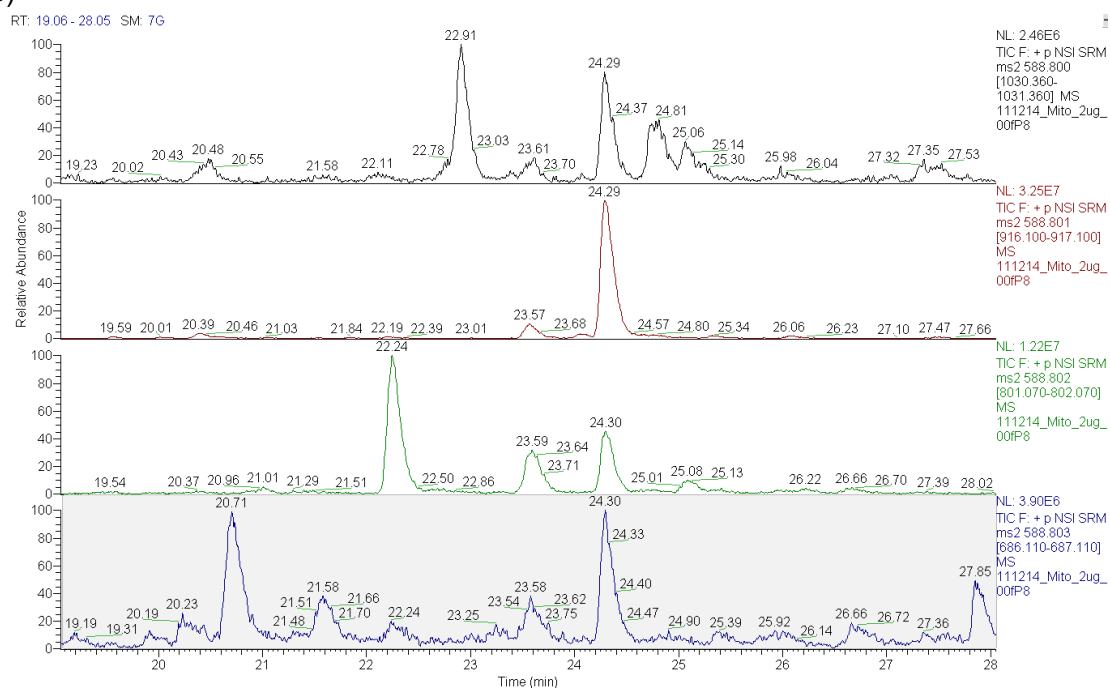


Figure (24) Analyse de P8_2U1 dans les mitochondries (a), et les mitochondries dopées par 100 fmol de P8 (b), (2 μ g injectés).

Le CYP2U1 n'a pas été détecté dans le microsome de cerveau non plus (Figure 25).

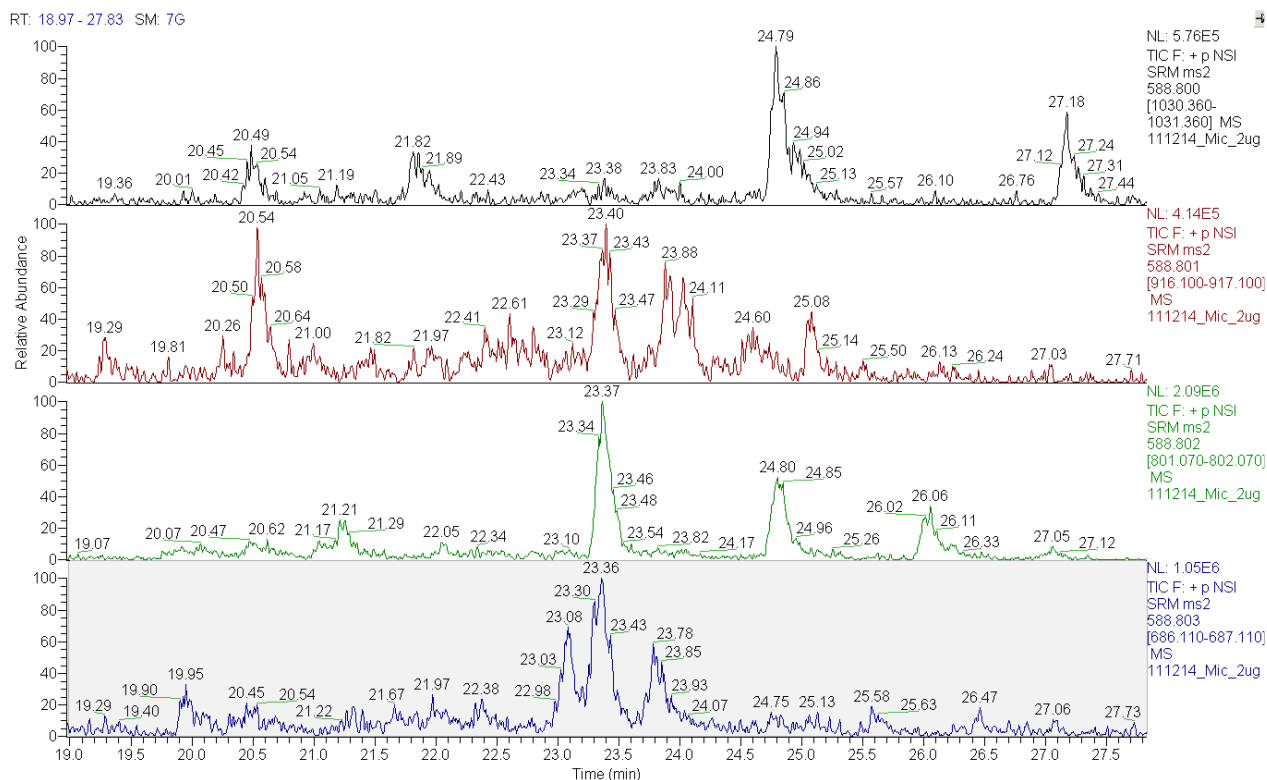


Figure (25) Analyse de P8_2U1 dans le microsome de cerveau, (2 μ g injectés).

1.12.4 Discussion

Cependant, la présence du CYP2U1 dans le microsome et la mitochondrie de cerveau humain a été confirmée par WB (Figure 26. a). La mitochondrie contient plus de CYP2U1 par rapport au microsome et moins par rapport à SH_2U1 20 MOI. L'anticorps utilisé est un anticorps reconnaissant le C-terminal (LTLAPHPFNITISRR) (Karlgrén *et al.*, 2004). La présence des CYPs 2D6, 2J2 et 2U1 dans le cerveau a été confirmée précédemment par notre équipe (Dutheil *et al.*, 2009) (Figure 26. b).

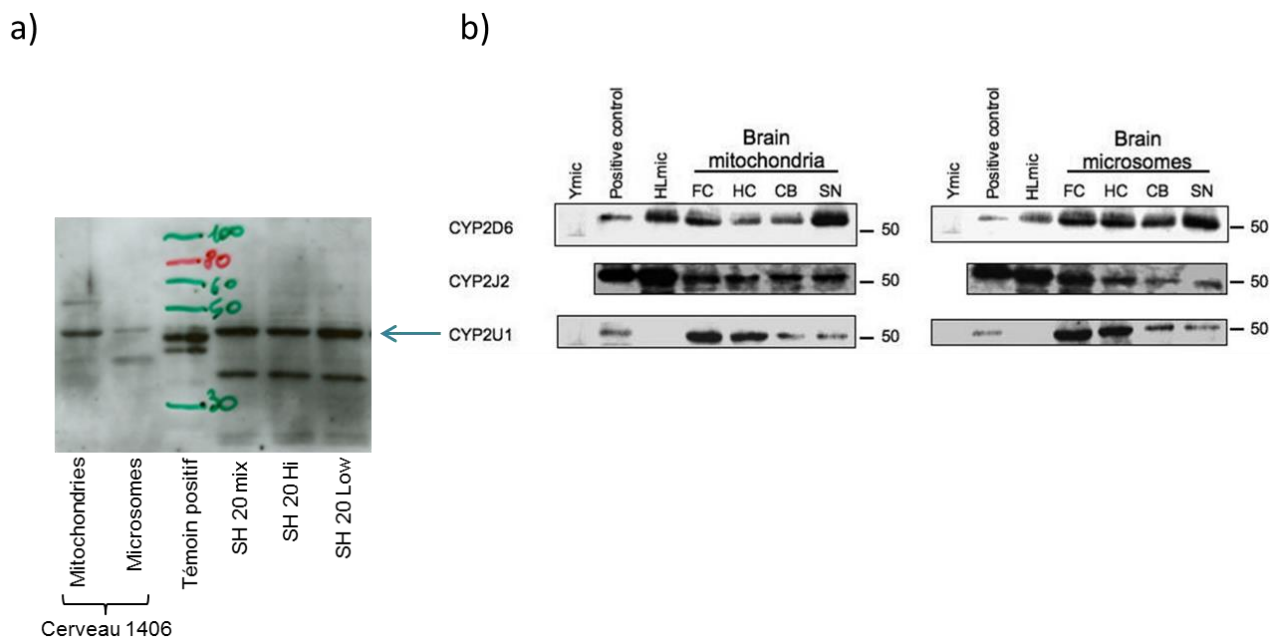


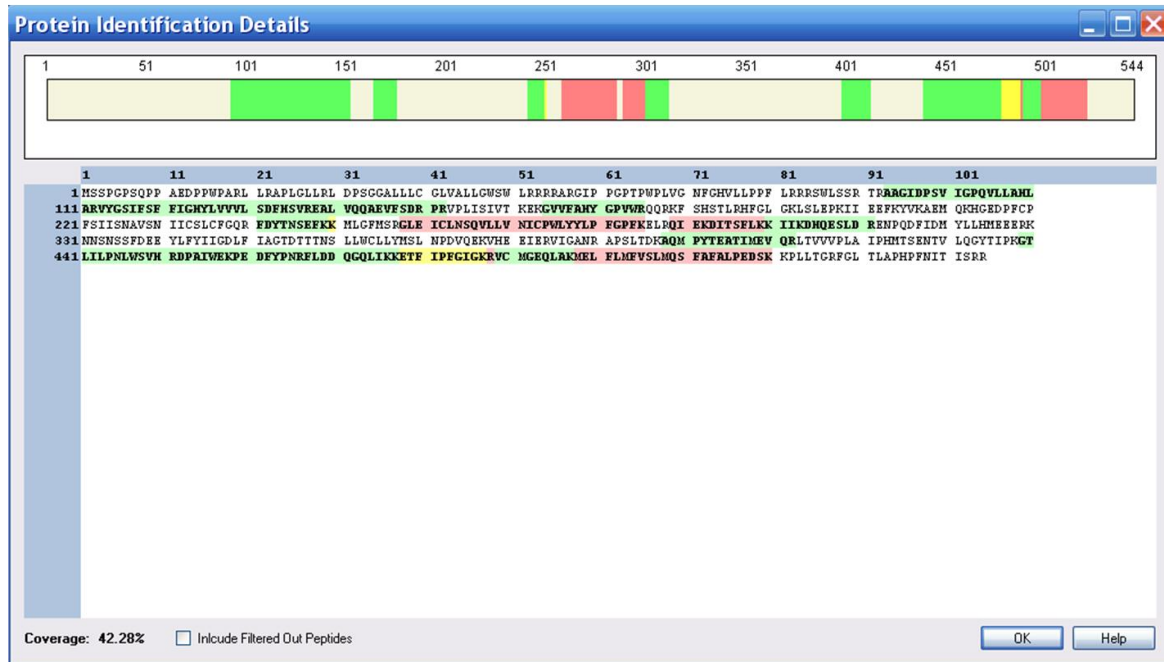
Figure (26) Détection de CYP2U1 dans les SH_2U1 et le microsome et la mitochondrie de cerveau 1406 (a), détection des CYPs 2U1, 2D6 et 2J2 dans les différentes parties de cerveau humain (b) (Dutheil *et al.*, 2009), FC :lobe frontal.

Le CYP2U1 a un poids moléculaire de 61 kDa (40 acides aminés en plus que les autres CYPs) mais l'anticorps le reconnaît à 50 kDa.

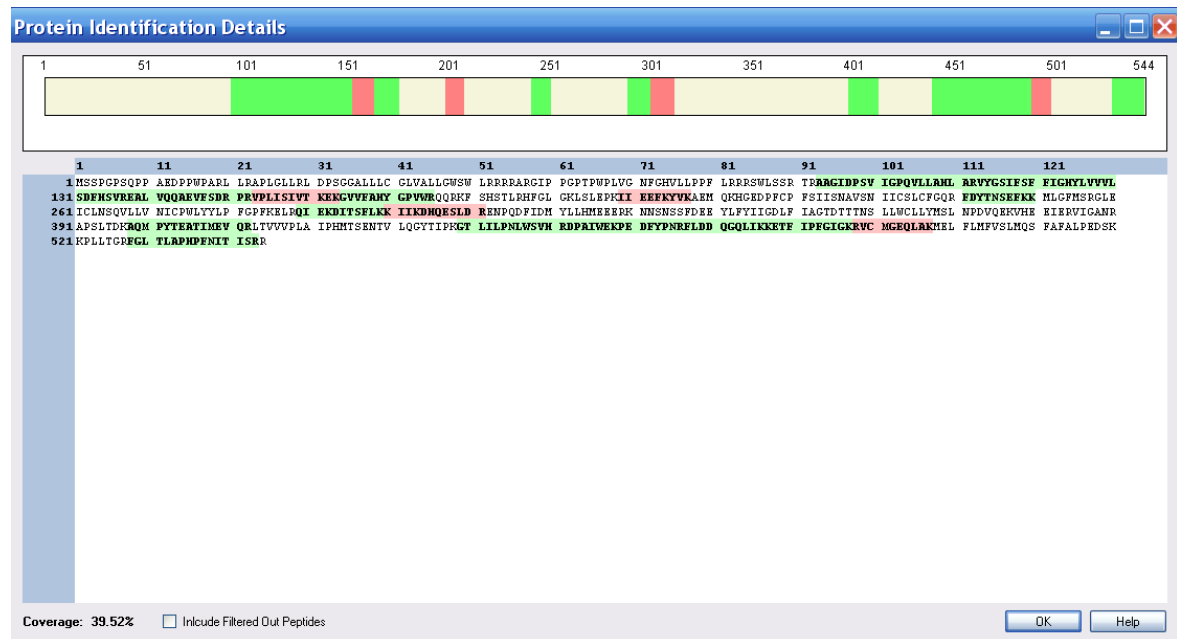
Le CYP2U1 a été quantifié ($0,44 \pm 0,18$ pmol/mg) dans des micro vaisseaux de cerveau humain en utilisant le peptide APLGLLR (Shawahna *et al.*, 2011). Le peptide APLGLLR est à la position (23-29) en N-terminal.

Le CYP2U1 recombinant surexprimé dans différents systèmes d'expression (baculosome®, insecte, *E. Coli* et SH_2U1) a été analysé en nano-LC-orbitrap afin de chercher les PPs. La partie C-terminale y compris le P8_2U1 (⁴⁶⁷FLDDQGQLIK⁴⁷⁶) a été trouvée dans tous les échantillons. La partie N-terminale (les premières 91 acides aminés) n'est retrouvée dans aucun échantillon (Figure 27). Les résultats sont présentés ci-dessous.

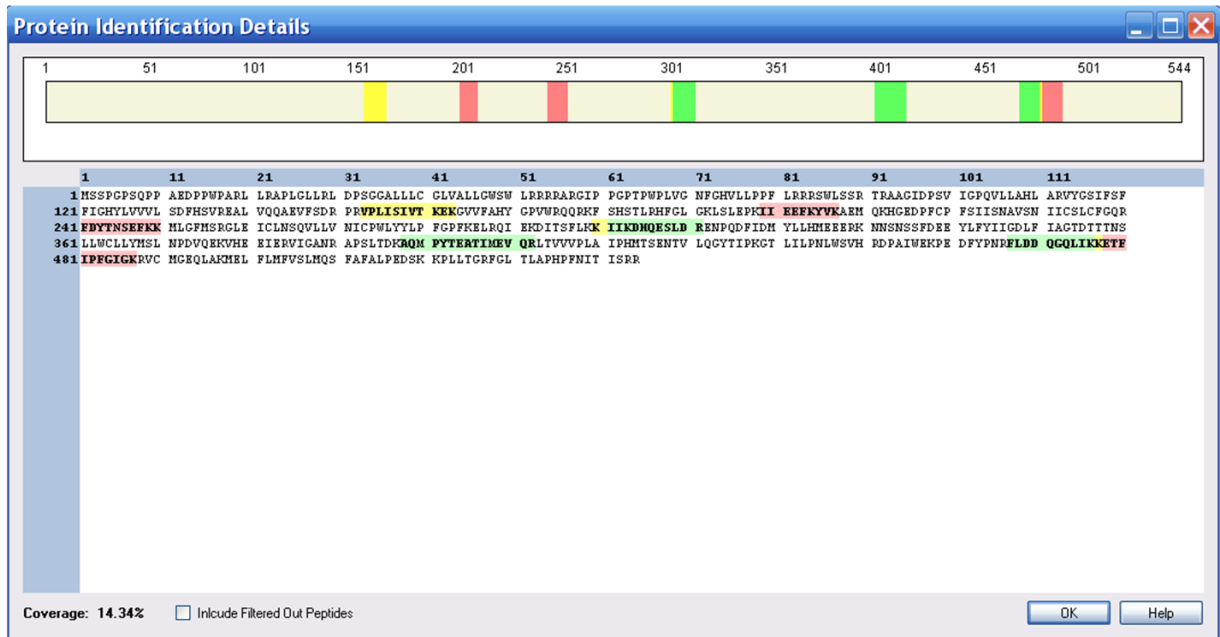
a) baculosome®



b) insecte



c) E. Coli



d) SH_2U1

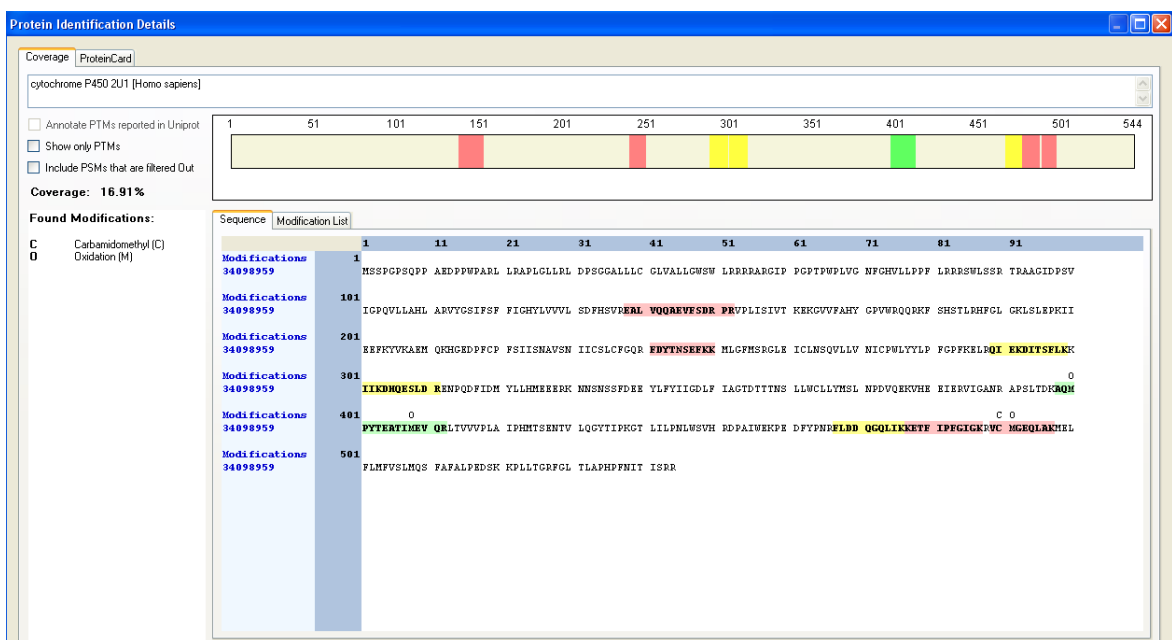


Figure (27) Partie de la séquence de CYP2U1 identifiée dans différents systèmes d'expression. La partie colorée est la partie identifiée, vert : bon score, jaune : score moyen, rouge : mauvais score. Les couleurs correspondent à des probabilités de faux positif ; vert inférieure à 1% jaune entre 1 et 5% rouge supérieur à 5%. Le taux de faux positif (FRD false discovery rate) est obtenu statistiquement par comparaison avec les résultats de recherche dans une banque de protéine dont les séquences sont inversées (decoy bank).

Pour conclure, en utilisant notre méthode de nano-LC, nous n'avons pas réussi à détecter le CYP2U1 dans les échantillons de cerveau humain (microsomes et mitochondries préparés de la partie lobe frontal de deux cerveaux 1406 et 1672). Nous pouvons proposer deux hypothèses pour expliquer ce résultat :

- La quantité de CYP2U1 dans le cerveau est très faible (inférieure à notre limite de détection ; 5 fmol injecté).
- La matrice de cerveau est très complexe (cela est vérifié par l'effet de la matrice) ce qui empêche l'ionisation et la détection des PPs de CYP2U1.

Diminuer l'effet de matrice nécessite une amélioration de l'étape de préparation des échantillons (purification, enrichissement, ...) afin de réduire la complexité de l'échantillon et enrichir l'extrait en analyte et par conséquent améliorer la limite de détection.

Enfin, l'analyse de CYP2U1 dans les différents systèmes d'expression et dans le cerveau a été réalisée sans prendre en compte la sur-alkylation par l'IAA. On a remarqué plus tard un effet négatif de l'IAA sur les peptides dans les échantillons biologiques. L'effet de l'IAA sur le P8_2U1 n'a pas été évalué.

1.12.5 Quantification du CYP2U1 dans la ligné SH par UPLC-TQ

Le CYP2U1 a été quantifié dans les SH_2U1 par couplage UPLC-TQ puisque le temps d'analyse est très court en UPLC par rapport à la nano-LC (16 min contre 60 min par injection) et les SH_2U1 surexpriment le CYP2U1 en quantité importante. Une gamme d'étalonnage a été préparée en ajoutant P8_2U1 dans la matrice SH (S9) avant la digestion afin d'injecter des quantités croissantes entre 50 et 2000 fmol. 4 µg de protéines ont été injectés (Figure 28). Le coefficient de corrélation est 0,989 et le coefficient de variation est (1,6-7,4%). Pour une gamme restreinte de 50 à 500 fmol, le coefficient de corrélation est 0,999.

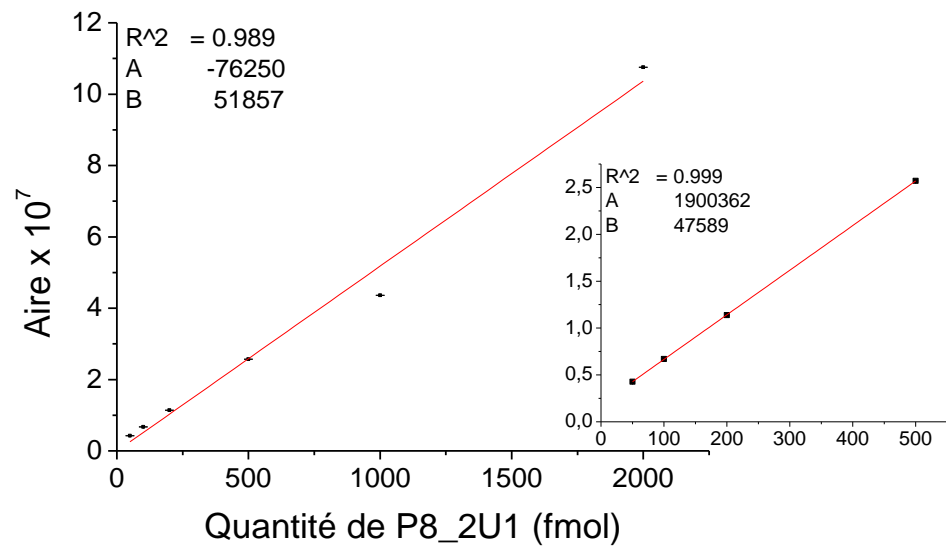


Figure (28) Gamme d'étalonnage de P8_2U1 dans la matrice SH (S9).

Des échantillons de SH_2U1, transfectés par des quantités différentes de virus 20, 50 et 100 MOI, ont été quantifiés (Figure 29). Le résultat montre une bonne linéarité de la réponse entre les quantités de CYP2U1 et les niveaux d'expression. En fait, ces valeurs dépendent de la quantité de virus utilisée pour transfecter les cellules.

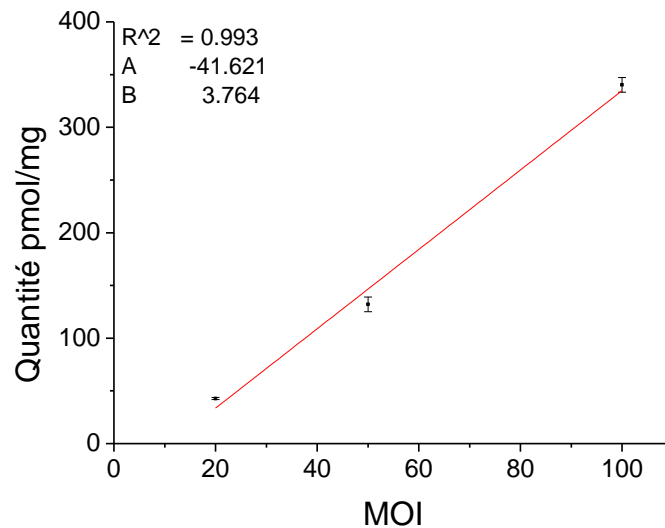


Figure (29) Quantité de CYP2U1 en pmol/mg en fonction de MOI.

Nous avons développé une méthode en couplage UPLC afin de quantifier le CYP2U1 dans un système d'expression hétérologue (lignée neuronale SH) dans lequel ce CYP est exprimé en

grand quantité par rapport au cerveau. L'effet de matrice n'a pas posé aucun problème puisque le signal correspond au P8_2U1 est suffisant et dans la gamme. La linéarité de la gamme est comprise entre 50 et 2000 fmol montrant un CV entre 1,6 et 7,4%. Cette méthode nous permet de réaliser des études toxicologiques sur des modèles cellulaires proches de cerveau humain.

1.13 Publication 1

1.13.1 Introduction

Le but de cette partie du travail était de mettre au point une méthode de dosage des CYPs par spectrométrie de masse applicable aux milieux biologiques. L'optimisation et la validation de la méthode ont été réalisées en tenant compte de l'état de l'art, de l'instrument dont nous disposons ainsi que de la problématique biologique que nous posons afin de garantir le coût le plus faible. Nous avons choisi de montrer que notre méthode est valide et applicable, sur différents systèmes d'expression hétérologues (HepG2 et baculosomes) et sur 5 échantillons de foie humain (microsomes et mitochondries).

La méthode a été développée et validée puis ses applications biologiques ont été démontrées.

1.13.2 Publication 1

Optimization and validation of a label
free MRM method for the quantification
of cytochrome P450 isoforms in
biological samples

Optimization and validation of a label free MRM method for the quantification of cytochrome P450 isoforms in biological samples

Ahmad Al Ali^{1,2}, David Touboul¹, Jean-Pierre Le Caër¹, Isabelle Schmitz-Afonso¹, Jean-Pierre Flinois², Catherine Marchetti², Isabelle De Waziers², Alain Brunelle¹, Olivier Laprévote^{3,4}, Philippe Beaune²

¹ Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

² Médecine Personnalisée, Pharmacogénomique et Optimisation Thérapeutique, INSERM UMR-S1147, Centre Universitaire des Saints-Pères, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, 45 rue des Saint Pères, 75270 Paris Cedex 06, France

³ Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, UMR CNRS 8638, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

⁴ Service de Toxicologie Biologique, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

Corresponding author:

Abstract

Cytochromes P450 (CYPs) play critical roles in oxidative metabolism of many endogenous and exogenous compounds. Protein expression levels of CYPs in liver provide relevant information for a better understanding of the CYPs importance in pharmacology and toxicology. This work aimed at establishing a simple method to quantify six different CYPs (3A4, 3A5, 1A2, 2D6, 2C9, and 2J2) in various biological samples without isotopic labeling. The standard peptides were spiked into the biological matrix prior to the digestion step to realize a label-free quantification by mass spectrometry. The method was validated and applied to quantify these six isoforms in both human liver microsomes and mitochondria, but also in recombinant expression systems such as baculosomes and HepG2 cell line. The results showed intra- and inter-assay accuracy and precision within 16% and 5%, respectively, at the low-quality control (LQC), and then demonstrated the advantages of the method in terms of reproducibility and cost.

Keywords: Cytochrome P450, mass spectrometry, multiple reaction monitoring, label-free quantification, liver microsomes, baculosomes.

I. Introduction

Cytochromes P450 (CYPs) are a superfamily of hemoproteins which play critical roles in oxidative metabolism of many endogenous and exogenous compounds, including fatty acids, hormones, and most drugs (Guengerich, 2004, Ortiz de Montellano, 2005). In humans, 57 genes encoding for CYPs are grouped in accordance with their sequence homology in 18 families and 42 subfamilies. The CYPs are mainly localized in the endoplasmic reticulum (ER) and in lesser amounts within mitochondria (Lewis, 2004). CYPs show a variability of expression under the control of different factors: induction, inhibition, genetic polymorphisms and pathophysiological changes (Zanger and Schwab, 2013). These variations of expression can have a significant impact on the metabolism process of xenobiotics including drugs. Quantitative analysis of the expression of CYPs in the liver, which is the most important site of metabolism in humans, are of particular importance since the biotransformation carried out by CYPs is often a critical factor which affects the efficiency, availability and toxicity of drugs in humans (Ortiz de Montellano, 2005).

Several direct or indirect techniques have already been used to quantitatively evaluate the amount of these enzymes. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to measure the amount of messenger ribonucleic acid (mRNA) by amplification (Nishimura *et al.*, 2003, Bièche *et al.*, 2007). The drawback of this technique is the poor relationship between mRNA and protein expression (Huber *et al.*, 2004, Williamson *et al.*, 2011). Enzyme activity assay provides also indirect estimation of protein levels but one reaction can be catalyzed by more than one CYP and, in some cases, the specific substrates are not available. Direct methods have also been used to quantify these enzymes, as immunolabeling, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Snawder and Lipscomb, 2000, De Bock *et al.*, 2012) or Western Blot (Shimada *et al.*, 1994, Paine, 2006). These techniques are limited by the availability and specificity of the antibody, especially for the isoforms from the same subfamily which have a high degree of sequence homology.

The lack of information at the protein level provided by transcription and immunologic methods opened the door for using mass spectrometry (MS), which is one of the most effective methods to analyze proteins due to its high specificity and its ability to quantify proteins in a complex mixture (Hoffmann and Stroobant, 2007).

Recently, several quantitative MS methodologies were applied for relative and absolute quantification of CYPs in biological samples. Isotope-coded affinity tags (ICAT) (Jenkins *et al.*, 2006, Duan *et al.*, 2007), isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) (Wang *et al.*, 2006), dimethylation (Huang *et al.*, 2011), acetylation (Jia *et al.*, 2007), ¹⁸O stable isotope labelling (Lane *et al.*, 2007), absolute quantification (AQUA) using stable isotope labelled

peptides, protein standard absolute quantification (PSAQ), quantification concatamer (QconCAT) were successfully applied to CYPs dosages.

AQUA strategy was the most often used approach to quantify the CYPs in human liver microsomes (HLMs) using isotopic labeling peptides and multiple reaction monitoring (MRM) analysis. CYPs 3A, 3A4 and 3A5 were quantified in a pool of human liver (Wang *et al.*, 2008), CYP2D6 in 30 HLMs (Langenfeld *et al.*, 2009), CYP2E1 in a female sample of HLM (Wang *et al.*, 2006), CYPs 2E1 and 1A2 in four and three HLMs, respectively (Seibert *et al.*, 2009), and 11 and 13 CYPs isoforms in 10 and 17 HLMs, respectively (Kawakami *et al.*, 2011; Ohtsuki *et al.*, 2012). This approach was also used to quantify some abundant isoforms in particular tissues, such as CYPs 2U1 and 1B1 in human brain microvessels (Shawahna *et al.*, 2011). The PSAQ strategy was followed to quantify CYPs 46A1 and 27A1 in human retina and human brain (Liao *et al.*, 2010). Quantification of 13 CYPs in 24 HLMs by QconCAT technique was recently published (Achour *et al.*, 2014). Besides, AQUA-MRM showed high analytical reproducibility but a significant increase of the cost and the time for both method optimization and analysis especially when a large number of analytes is targeted (Zhang *et al.*, 2011; Pailleux and Beaudry, 2012).

The so-called label-free methods require neither labeling step nor complex sample preparation. Several approaches were used for label-free quantification of CYPs: the extracting ion currents (XICs) to quantify relatively CYP 2D6.1, CYP 2D6.2 and CYP 2D6.10 in purified proteins and supersomes (Yu *et al.*, 2009), exponentially modified protein abundance index (emPAI) to quantify 18 CYPs in human liver microsomes (HLMs) (Seibert *et al.*, 2009), scan counts (SC) to quantify relatively 27 CYPs in HLMs (Sun *et al.*, 2012), number of tryptic peptides to estimate the CYP expression profile in 32 HLMs (Shrivastava *et al.*, 2013). These label-free methods are simple and inexpensive but the quantitative accuracy is limited due to the absence of reference peptides (Zhang *et al.*, 2011).

In addition, laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry technique (LA-ICP-MS) was used to obtain the semi-quantitative estimation of CYPs 2E1 and 1A1 in microsomes of rat treated with 3-methylcholanthrene and in duodenal microsomes of mini-pigs orally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons by using specific monoclonal antibodies labelled with europium or iodine (Roos *et al.*, 2008).

The aim of this work was to optimize and validate a method in order to quantify 6 CYP isoforms (3A4, 3A5, 1A2, 2D6 2C9 and 2J2) by LC-MRM mass spectrometry, without any isotopic labeling, and in different biological matrices including HLMs.

Label-free quantification of CYPs using external calibration curves was previously reported (Alterman *et al.*, 2005) but the matrix (bovine serum albumin [BSA] solution) in which calibration

curves were obtained was too simple to correctly mimic more complex biological environments. In this study, we improved this technique using a complex matrix which is very close to the targeted samples.

The method that we have developed is simple and allowed to measure the 6 targeted CYPs in HLMS and CYPs overexpressed either in hepatic cell lines or in baculovirus infected insect cells (baculosomes).

II. Materials and methods

II.1 Reagents

Acetonitrile (ACN) (LC-MS grade Baker) was purchased from INTERCHIM (Montluçon, France). Formic acid (FA), trifluoroacetic acid (TFA), ammonium dihydrogenocarbonate, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapinic acid, iodoacetamide (IAA), dithiotreitol (DTT), sodium cholate, cysteine, trypsin 'trypsin-type IX-S from porcine pancreas' were supplied by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Glass vials and inserts of 150 μ L were purchased from Waters (Guyancourt, France).

All peptides were synthesized by GenScript USA Inc (Piscataway Township, USA) The recombinant human CYPs (1A2, 2D6, 2C9, 3A4, 3A5) were expressed in insect cells (infected with baculovirus) and microsomal fractions (baculosomes) were used for the quantification. The baculosomes were purchased from Gentest, BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). The reagents for cell culture were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France).

Human liver samples stored at -80°C were purchased from Kaly-Cell (Plobsheim, France).

II.2 Sample preparation

II.2.1 Liver fractions

Liver fractions (mitochondria and microsomes) were processed using differential centrifugation as described previously (Kremers *et al.*, 1981). Frozen livers were partially thawed in sodium chloride 150 mM, cubed with scissors, washed in sodium chloride 150 mM, crushed (1 g / 5 mL) in buffer (sucrose 250 mM, Tris/HCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) with an Ultra-Turrax for 10-20 s and further homogenized using Potter-Elvehjem homogenizer. The homogenate was successively centrifuged at 800 *g* for 10 min, and at 13,500 *g* for 20 min to isolate the mitochondria. The supernatants were ultracentrifuged at 105,000 *g* for 60 min to isolate the microsomal fraction. Both mitochondria and microsomal pellet were washed with 100 mM sodium pyrophosphate pH 7.4. The liver fractions (mitochondria and microsomes) were suspended in sodium phosphate 100 mM, without protease inhibitor, and stored at -80°C .

II.2.2 The human hepatoma cell line (HepG2)

The hepatic cell line HepG2 was grown in minimal essential medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and supplemented with penicillin (200 UI/mL), streptomycin (50 µg/mL), l-glutamine (0.3 mg/mL), sodium pyruvate (1 mM), and fungizone (0.5 µg/mL).

II.2.2.1 Recombinant adenovirus (Ad)

CYP1A2 and CYP2J2 cDNA were cloned in our laboratory (INSERM UMR-S1147), sequenced and then sent to the University Hospital of Nantes supported by the *Association Française contre la Myopathie*. Replication defective E1 and E3 region deleted adenovirus encoding CYP1A2 (Ad-1A2) and CYP2J2 (Ad-2J2) were constructed, purified and titered (He *et al.*, 1998)

Adenoviral infection and biotransformation assays: HepG2 cells were seeded at 10⁶ cells/T-25 flask. Twenty four hours later, the cells were incubated for 4 h with Ad at a concentration of 5 to 15 multiplicity of infection (MOI) for Ad-2J2 and 25 to 150MOI for Ad-1A2 to the cell culture medium containing 2% FBS. After 4 hours, the Ad-containing medium was removed and replaced with normal HepG2 medium.

II.2.2.2 Recombinant lentivirus (LV)

Human CYP1A2, 2C9, 2D6, 2J2, 3A4 and 3A5 cDNA were cloned in our laboratory, inserted in a pHAGE-PGK-MCS-IRES-GFP vector and sequenced. Plasmids were sent to the Viral Vector and Gene Transfer Platform (Paris Descartes University, Necker hospital Paris, France) to produce recombinant lentivirus HIV-1 ΔU3 SIN with G glycoprotein gene from Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) as a pseudotyping envelope. Titration of viral productions was performed by Fluorescence-activated cell sorting FACS (green fluorescent protein GFP) after infection of HTC116 cells.

Lentiviral infection: HepG2 cells were infected with lentiviral particles at an MOI of 20. Infected cells were sorted by FACS to isolate cells expressing high GFP levels.

HepG2 cells infected with adeno or lentivirus were trypsinated, sonicated and microsomal fractions were prepared as described for HLMS.

Total protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid method (BCA protein assay kit) from Pierce -Thermo Scientific.

II.3 Tryptic digestion

In-solution digestion was performed as described previously (Liao *et al.*, 2010) with the following modifications. For the liver samples, 100 µg of microsomal or mitochondrial protein were dissolved in a volume of NH₄HCO₃ 50 mM to obtain the same volume and the same

concentration of protein for all samples. An equal volume of 4% sodium cholate (between 1 to 2% final concentration) prepared in 50 mM of NH_4HCO_3 was added. A volume of 10% (v/v) dithiothreitol (DTT, 100 mM) was further added. The mixture was heated at 56 °C for 30 minutes. Free sulfhydryl groups were then alkylated by addition of iodoacetamide 15 mM (30 min, room temperature in dark). Excess iodoacetamide was quenched with 300 mM cysteine (30 min in dark at room temperature). Trypsin was finally added at an enzyme/substrate ratio of 2:100 for 16h at 37 °C. After trypsinolysis, TFA 0.5% (v/v) was added to stop the digestion and eliminate the sodium cholate which becomes insoluble with an acidic pH. The samples were centrifuged for 20 min at 10,000 *g* at 4 °C. The supernatant was transferred to another tube and dried in a speed-vac and then stored at –80 °C until analysis. For the calibration curves and the quality control samples (QC), the digestion of matrix (Mic_HepG2) was performed as described for the samples, except that 25 µg of protein were used. After quenching the excess of IAA with cysteine, standard peptides, dissolved in water/ACN 80/20 v/v, were added in the mixture, prior to the trypsin digestion step. Calibration curves were prepared with the following injected amounts (12.5, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, and 4000 fmol) and QC samples were injected at 75, 500, and 1000 fmol of standard peptides. Before LC-MS/MS analysis, each sample was spiked with 5 pmol of glu-fibrinopeptide, as an analytical standard (AS), in 50 µL of $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{FA}$ (94/5/1 v/v/v) and centrifuged again at 10,000 *g* for 20 min. 10 µL of supernatant was injected. Other types of biological samples were also studied: microsomes of HepG2 cells and baculosomes. The calibration curves and the quality control samples (QC) were prepared in the same blank matrix as the respective targeted samples. For these samples, the amount of protein used for tryptic digestion was 25 µg.

II.4 LC-MS analyses

All digests were analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Accela, TSQ Vantage, Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). The chromatographic separation was performed with an octadecyl UPLC column (Acquity BEH130 C18, 2.1 × 100 mm, 1.7 µm). The mobile phases were A (water, 0.1% FA) and B (ACN, 0.1% FA). The peptides were eluted at a flow rate of 350 µL/min, from 5 to 56% of B in 9 min. The autosampler and column were maintained at 4 °C and 40 °C, respectively. Experiments were achieved using an electrospray source in the positive mode with the following parameters: spray voltage 3500 V, vaporization temperature 250 °C and capillary temperature 300 °C. The mass spectrometer was set in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Peak area integrations were performed using Xcalibur (2.0.7) software (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

Identification of target peptides was performed on a Dionex U3000 nano-HPLC system coupled to a LTQ-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) equipped with a nanoelectrospray source. Two micrograms of HLM digests were loaded into a pre-column (0.3 mm × 5 mm, 5 µm) and separated using a PepMap™ C18 column (0.075 × 150 mm, 5 µm). The mobile phases were A (water, 0.1% FA) and B (ACN). The peptides were eluted at a flow rate of 200 nL/min, from 2 to 60% of B in 40 min. The mass spectrometer was operated in the data-dependent mode to switch automatically between Orbitrap™ MS and LTQ MS/MS. Survey full scan MS spectra from m/z 450 to m/z 2000 were acquired with a fixed mass resolution $M/\Delta M = 60,000$ at m/z 400, after accumulation of 500,000 charges in the linear ion trap. The ions with the most intense signals (up to six, depending on signal intensity, with a trigger threshold value fixed at 400) were sequentially isolated for collision-induced dissociation (CID) experiments in the linear ion trap at a target value of 100,000 charges. The resulting fragments were recorded in the linear trap. MS/MS scans were acquired using an isolation window of 1 Th, an activation time of 30 ms, an activation q of 0.250 and 35% normalized collision energy. Target ions already selected for MS/MS were dynamically excluded for 30 seconds. Identification of protein was performed with Mascot 2.4 (Matrix Science Ltd.) and unique sequences of peptides were checked from the list of identified peptide using FASTA 3 or Pinpoint™ software (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

MALDI analyses were performed using a 4800 MALDI TOF/TOF (AB Sciex, Les Ulis, France) mass spectrometer. A solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) at 4 mg/mL (water/ACN/TFA 50/50/0.1 v/v/v) and a solution of sinapinic acid at 10 mg/mL (water/ACN/TFA 50/50/0.1 v/v/v) were used as matrices for peptide and protein analysis, respectively. Acquisitions were done in the positive linear mode for the digestion control of proteins and in the reflectron positive mode or MS/MS mode for the control of peptide alkylation.

III. Results and discussion

III.1 Method development

III.1.1 Identification of target peptides and optimization of the MRM method

The proteotypic peptides (PPs) for quantification of each CYP isoform were experimentally determined. On the one hand, two different samples of HLMs were separately digested in gel and analyzed using nanoLC-MS/MS leading to a first list of peptides. On the other hand, a list of peptides was issued from the *in silico* tryptic digestion of the CYP sequences (Pinpoint™ software). Proteotypic peptides were targeted according to the selection criteria reported in the literature (Kamiie *et al.*, 2008, Seibert *et al.*, 2009, Langenfeld *et al.*, 2009) and preliminary linearity tests. At least one proteotypic peptide for each CYP was then synthesized (Table 1).

The peptides AFLTQLDELLTEHR (CYP2D6) and LSLGGLLQPEKPVVLK (CYP3A4) showed no linear response for the studied dynamic range (Figure S1). They are the most hydrophobic peptides among the studied peptides. However, LSLGGLLQPEKPVVLK was used previously to quantify CYP3A4 in a CYP induction study (Williamson *et al.*, 2011) and AFLTQLDELLTEHR was proposed in a recent study as candidate for MRM quantification (Shrivastava *et al.*, 2013). LDTQGLLQPEKPIVLK (CYP3A5) and IGSTPVLVLSR (CYP1A2) showed higher intensity than DTINFLSK and YLPNPALQR respectively (data not shown). The peptide $^{381}\text{DIEVQGFR}^{388}$ (CYP2D6) has two single nucleotide polymorphisms (SNPs) (E383K for 2D6*72 and R388H for 2D6*95), and the peptide $^{80}\text{IGSTPVLVSR}^{90}$ (CYP1A2) has a SNP (T83M for 1A2*9). However these SNPs are extremely rare (<http://www.cypalleles.ki.se>) and they have not been detected in our bank of human liver (sequenced by Integragen [Évry, France]).

Finally, one proteotypic peptide was chosen for each CYP isoform to optimize the MRM method (Figure 1, Table 2).

III.1.2 Overalkylation and cysteine

In proteomics studies, disulfide bonds are usually reduced to thiol groups with a reducing agent such as dithiothreitol. Afterwards, iodoacetamide (IAA) is used as an alkylating reagent of the cysteine thiols. This reaction prevents the restoring of disulfide bonds by the formation of S-carboxyamidomethylcysteine which increases the mass by 57 Da for each modified cysteine group. To make sure that all cysteines are modified, an excess of reagent is often used.

Overalkylation can occur at the free *N*-terminal and *C*-terminal groups, in addition to peripheral residues bearing protic functional groups (Yang and Attygalle, 2007). In order to find out how these overalkylations by IAA affect our peptides during sample preparation, MALDI experiments were performed. The results obtained for the peptide GIFPLEAR (CYP2C9) are displayed in Figure 2. The comparison of the MS² spectra of the native peptide ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 902.46 and the $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion at m/z 959.47 of the alkylated peptide reveals that the alkylation has taken place at *N*-terminal. The y_1^+ ions show the same m/z ratio whereas the m/z ratio of b_2^+ ions were differentiated by 57 amu.

In order to prevent the peptides overalkylation, 300 mM of cysteine were added to the mixture after the alkylation step. Then the standard peptides were added, before the digestion step, to perform the calibration curves. As an example, the result for the 1A2 peptide is shown in figure (3), with and without cysteine. Quenching free IAA by cysteine in matrix digest leads to a four-fold increase of the ion intensity. Similar results were also noticed for the 2J2, 2D6, 3A4 and 3A5 peptides with intensities multiplied by factors 2.8, 1.3, 1.3, and 1.3, respectively (Figure S2).

The protecting effect of cysteine against the overalkylation was also evaluated in HLMs samples. The results indicated that quenching free IAA by cysteine in HLMs digest enhances the signal by a factor of 4 and 5 for the 1A2 and 2C9 peptides, respectively (Table S1). The protecting effect of cysteine was also noticed for the other peptides with a minor impact. Close results were noticed in HLMs and Mic_HepG2 matrix for all peptides.

Surprisingly, protection of tryptic peptides against the overalkylation by IAA was not previously reported in the literature for quantification studies. However, cysteine was already used to neutralize the free IAA in a proteomic study (Violette *et al.*, 2012). Another reagent, *i.e.* 2,2'-thiodiethanol, was also proposed to neutralize the free IAA to avoid its adverse effects on proteins and peptides (Boja and Fales, 2001).

III.1.3 Calibration curves of proteotypic peptides in biological matrices

Calibration curves of PP were prepared by spiking the standard peptides prior to digestion in the microsomal fractions of HepG2 cell line. The use of the microsomal fractions of HepG2 cells (Mic_HepG2) as matrix was not reported before. Other studies reported preparation of calibration curves based on solutions containing BSA or β -lactoglobulin in order to quantify CYPs 2B1 and 2B2 in rat liver microsomes (Alterman *et al.*, 2005). Human serum albumin (HSA) and BSA were also used as matrices for quantification of (MRP2/ABCC2) and (UGT1A1 and UGT2B7) in HLMs respectively (Sato *et al.*, 2012a, Sato *et al.*, 2012b). In our study, the Mic_HepG2 was used due to several advantages; it represents analytically the closest matrix model to HLMs, therefore inducing similar matrix effects and improving accuracy and precision of the quantification method and it was certified as a blank matrix, *i.e.* free from PPs of CYPs (Figure 4). Additionally, Mic_HepG2 were prepared according to the same processes than HLMs. It must be noted that CYP3A4 sample showed an unidentified peak at 4.2 min which was fully separated from the analyte peak (5.12 min) (Figure 4a and b).

Sodium cholate, a classical detergent in CYPs purification, was added as a trypsin compatible detergent to improve the yield of CYPs digestion. Sodium cholate has been reported to be slightly more efficient in comparison to RapiGest Sf surfactant for CYP quantification (Liao *et al.*, 2010a). In our study, the use of both detergents showed a similar effect on the peak areas of the peptides in the HLMs' digest, sodium cholate was chosen for economic reasons.

To evaluate the completeness of the digestion, digests of HLMs and mitochondria were first examined by MALDI-MS. The absence of signals at the high m/z values illustrated a good yield of protein digestion. Secondly, digests of three HLMs and three mitochondria were examined by using RawMeat 2.1 software (VAST Scientific). The small number of peptides with high charge states (4, 5 and 6) indicated a rather complete tryptic digestion (Figure S3).

In order to correct potential deviation of the analytical method, glu-fibrinopeptide GF (EGVNDNEEGFFSAR) was spiked in the samples prior to analysis, as AS. Several advantages lead to select this peptide as AS. First, it is naturally absent from the matrix. No interference peak was observed in the chromatograms of both digested matrix and HLMS (Figure 4a and c). Secondly, it generates reliable signal with low variability. Finally, its retention time is in the average of the standard peptides retention time range without interference.

The integrated peak areas of four transitions from the targeted peptides were summed and normalized to the sum of the peak areas of the AS. Calibration curves of peptides showed linear response in the range of 25 to 4000 fmol, with an AS quantity of 500 fmol (except for the 2J2 peptide VIGQGQQPSTAAR with an extended range from 12.5 to 4000 fmol) (Figure 5).

Peptide spiking was assessed prior and after tryptic digestion. For the peptide DIEVQGFR (CYP2D6), a loss of intensity of 15% was noticed when the reference peptide was added before rather than after the digestion step (Figure 6). Similar results were also obtained for the other PPs (data not shown). However, despite this loss of sensitivity, addition of the standard peptides to the sample before the digestion step ensures that the targeted natural peptides and the reference ones are submitted to the same treatments during the following analytical process.

Different types of matrices, in which CYPs were quantified, were examined in terms of sensitivity and dynamic range (Table 3). Total homogenate of HepG2 cell line (TH_HepG2) and baculosome matrix, without any CYP, were spiked with the standard peptides for the calculation of the calibration curves. The dynamic range was adapted to expected quantity of CYPs in different types of samples. R^2 and CV% showed high quality of linearity and precision in all type of matrix.

III.2 Method validation

III.2.1 Repeatability of tryptic digestion

The repeatability of the tryptic digestion was evaluated by preparation of two samples in triplicate and injecting each preparation three times. The CV of all 6 peptides was comprised between 1.3 and 4.3%. These results indicated that a good reproducibility of tryptic digestion.

III.2.2 Determination of the LOQ and validation of the presence of an analyte in biological samples

Three criteria were used to determine the limit of quantification (LOQ) of our method. First, the signal-to-noise ratio $S/N = 10$ was applied to the most intense transition for each peptide. Second, the coefficient of variation of three successive injections at the LOQ value (the lower range point) must not exceed 20%. Third, the recalculated value of LOQ according to the

calibration curve must have an inaccuracy of less than 20%. The LOQ value was determined at 25 fmol for all peptides except for the 2J2 peptide with a value of 12.5 fmol.

To validate the presence of a peptide in biological samples, three criteria were considered. First, the four transitions have the same retention time as in the calibration curve range. The retention time is adjusted according to the retention time of AS. Second, the CV calculated from three injections of the sample should not be greater than 15%. Third, for each peptide, the ratio of its transitions should not exceed $\pm 15\%$ of the nearest value in the calibration curve range. The third criterion is crucial to guarantee a good selection of analyte peak in complex matrices, also to compensate the absence of labeled internal standard.

III.2.3 Accuracy and precision of the quantification method

To evaluate the accuracy and precision, quality control samples (QC) were prepared at three levels low QC (LQC), medium QC (MQC) and high QC (HQC) at 75, 500, and 1500 fmol, respectively. The QC samples were analyzed against the calibration curve, and the obtained concentrations were compared with the nominal values (Table 4). Intra-assay inaccuracy, determined by 3 runs of the same sample, was within 7% in both high and medium QC samples and within 13% for LQC. Inter-assay inaccuracy in both high and medium QC samples was within 12% of the nominal value. Inaccuracy in low QC samples was within 16%. The method was precise for all QC samples with a CV below 5% in both intra- and inter-assays.

III.2.4 Stability of peptides in QC and biological samples

Stability of peptides in QC and biological samples was investigated according to experimental conditions. All samples were kept at 4 °C in the autosampler up to 24h and at –80 °C after preparation step up to 48 h. No freeze/thaw cycles were applied on QC and biological samples. The results indicated acceptable stability at the experimental conditions, all peptides showed values within 8% at autosampler conditions and within 4.1% at –80 °C for 48 h (Table 5).

III.3 Method application

The MRM method was applied to quantify the 6 CYP isoforms in different types of biological samples. First, quantities of recombinant CYPs, over-expressed in HepG2 cell line, developed in our laboratory, were evaluated. The recombinant CYPs were over-expressed using different amount of adenovirus to transfect cells. The analyzed samples correspond to microsomal fractions of cells, transfected with 5, 10, and 15 MOI (Multiplicity of Infection) for CYP2J2 and 25, 50, 100, and 150 MOI for CYP1A2. The results showed a good linearity of response between CYP's amounts and the expression levels which depend on the amount of virus used to transfect cells (Figure 7). We have also quantified 5 recombinant CYPs over-expressed in HepG2 cell line transfected with lentivirus. Different constructions HepG2_GFP and HepG2_GFP_CYP prepared in our laboratory were analyzed. The results show that the

amounts of CYPs over-expressed in HepG2 cell line are lower than their amounts in HLMs, except the CYP2D6 which is higher (Table 6). However the CYP expression is largely sufficient in those HepG2 cell lines to enable studying the metabolite production and pharmacological or toxicological effects.

Second, amounts of apoprotein in recombinant CYPs from commercial baculosomes were also investigated (Table 7). The samples were analyzed against calibration curves prepared in baculosomes without any CYP as matrix. The amounts of CYPs measured by MRM method were higher than the amounts measured by spectrophotometry and provided by the manufacturer. The high concentration of CYPs determined by MRM in comparison to these spectral measurements can be explained by the fact that spectral data reflect the amount of holoprotein, whereas MRM method measures the quantity of total CYP apoprotein. Accordingly, large variability in holoprotein levels (percentage of total apoprotein) was reported: 3.16 for CYP2D6.10 and 35.5% for CYP 2D6.1 (supersomes) (Yu *et al.*, 2009), 59% for CYP3A4 (supersomes) (Wang *et al.*, 2008), between 45 and 88% for CYPs 1A2, 2E1 and 2C19 (purified protein) (Alterman *et al.*, 2005). Our experimental results are in good agreement with published data (Table 7).

Quantities of these 6 CYPs were also measured in 5 human livers in both mitochondria and microsomal fractions (Table S2). The results of CYPs quantification of HLMs was in the same order of magnitude as immunochemistry (WB) or MS data (MRM) reported in different publications (Table 8). Thus, it validates our quantification approach.

For CYP3A5, it was also interesting to note that one of the liver was highly expressing it (54.4 pmol/mg), while the others showed much lower level of expression (between 4.3 and 8.7 pmol/mg) in good agreement with the results of the literature (Dennison *et al.*, 2007).

The CYP2J2 plays an important role in epoxy-eicosatrienoic acids (EETs) formation. It is overexpressed in different human tumor tissues and cancer cell lines (Xu *et al.*, 2013). In addition, it has a wide tissue distribution but it is a minor isoenzyme in liver (less than 1% (Zanger and Schwab, 2013)). Mean concentrations of 4.3 and 1.4 pmol/mg of CYP2J2 in HLMs and mitochondria were found, respectively. The digestion protocol used in the present study, including detergent-assisted digestion and peptide protection against overalkylation, might improve the number of detectable CYPs by MS, especially for low abundance ones such as CYP2J2.

Several CYPs, including members of family 1, 2 and 3, have been reported to be present in mitochondria (Avadhani *et al.*, 2011; Knockaert *et al.*, 2011) as well as in ER. To our knowledge, there is only limited information about CYP protein expression in mitochondria. In this study, we report the first quantification of 6 CYPs in mitochondria by MS. As expected the

quantity of these CYPs in mitochondria is lower than their quantity in HLMS but it is not negligible (Table 9).

IV Conclusion

In this paper, we reported a robust, fast and low-cost label free MRM method for the quantification of CYP isoforms in biological samples. Several improvements were made to conventional methods in course of this study. The use of a matrix very close to the biological samples and of standard peptides spiked prior to the digestion step increase the accuracy of the quantification. The protection of standard and natural peptides against overalkylation during the preparation steps improves the method performance by increasing the dynamic range and reducing the LOQ values. Analytical standard (AS) corrects retention time shifts and minimizes analytical errors. The ratio of transitions for each native peptide validates its identification by comparison to the ratio of transitions for standard peptide. Moreover UPLC allowed decreasing the analysis time significantly.

Nowadays, the use of stable isotope labeled peptides as internal standard is considered as a gold standard for quantitative assay by MS. However, our method, in which a non-endogenous internal standard is employed, demonstrates a high level of performance together with a reduced cost.

The use of this method allowed analyzing some of the 6 CYPs in HLMS, showing results comparable to the literature; in human liver mitochondria, showing the presence at lower concentration than in HLMS of these 6 CYPs; in baculosomes, showing the variable insertion of heme in a CYP apoprotein and in human hepatic cell line HepG2, showing the expression of CYPs transfected thanks to adeno or lentivirus.

The availability of a cheap and simple method for measuring CYPs, should allow precisely, in human liver microsomes and mitochondria, to determine the relationships between DNA polymorphisms, mRNA, protein expression and enzymatic activity.

Acknowledgments:

Financial support of the Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS-ICSN) is gratefully acknowledged.

List of tables

Table (1) Selected proteotypic peptides.

Table (2) Final method MRM optimized for quantifying CYPs.

Table (3) Dynamic range, linearity “equation $y=A+B*x$ ” and CV values in different matrices.

Table (4) Determination of inter-assay inaccuracy and precision in QC samples at three levels low QC (LQC), medium QC (MQC) and high QC (HQC) at 75, 500 and 1500 fmol, respectively.

Table (5) Stability of peptides in our experimental conditions.

Table (6) Quantity of 5 CYPs isoforms in HepG2 (GFP and GFP_CYP) in pmol/mg protein (SD).

Table (7) Concentration of five recombinant CYPs measured by different techniques.

Table (8) Quantity of 6 CYPs isoforms (Min-Max) in 5 HLMs in pmol/mg protein (grey line) and the amounts found by WB and MS in different references.

Table (9) Quantity of 6 CYPs isoforms (Min-Max) in mitochondria of 5 human livers in pmol/mg protein.

List of figures

Figure (1) Selection strategy of proteotypic peptides and optimization of MRM method.

Figure (2) (a) MALDI analysis of the peptide GIFPLEAR (CYP2C9) incubated with IAA. (b) MS/MS spectrum of the native peptide ion $[M+H]^+$ at m/z 902.46 and (c) MS/MS spectrum of the $[M+H]^+$ ion (m/z 959.47) of the alkylated peptide.

Figure (3) Calibration curve of the 1A2 peptide IGSTPVLVLSR in matrix (Mic_HepG2) with (black curve) and without (red curve) cysteine and without analytical standard.

Figure (4) a) Extracted ion chromatogram of the strongest transition for each peptide in the matrix Mic_HepG2. b) Extracted ion chromatogram of the strongest transition for each peptide at the limit of quantification (LOQ) value (25 fmol) except the 2J2 peptide VIGQGQQPSTAAR (12.5 fmol). c) Extracted ion chromatogram of the strongest transition for each peptide in a digested HLM sample.

Figure (5) Calibration curves of standard peptides spiked in matrix prior digestion. Peak area ratios are ratio of peak areas of standard peptide to that of AS. Each data point represents average \pm standard deviation (S.D.) of data collected for the four MRM transitions.

Figure (6) Calibration curves of the 2D6 peptide spiked in matrix prior (red curve) and after (black curve) the digestion step.

Figure (7) Quantities of recombinant CYPs 2J2 (a) and 1A2 (b), over-expressed in HepG2 cell line. MOI: Multiplicity of Infection.

Supplementary data

Table (S1) Peak area for each peptide in the digest of HLMs with and without cysteine.

Table (S2) Quantity of 6 CYPs isoforms in both microsomes (Mic) and mitochondria (Mito) of 5 human livers in pmol/mg protein (SD%).

Figure (S1) Calibration curve of the LSLGGLLQPEKPVVLK (CYP3A4) peptide (LOQ=100 fmol) and AFLTQLDELLTEHR (CYP2D6) peptide peptide (LOQ=200 fmol) in matrix (Mic_HepG2) prior to digestion with cysteine and without AS.

Figure (S2) Calibration curve of the (2J2, 2D6, 3A4 and 3A5) peptides in matrix (Mic_HepG2) with (black curve) and without (red curve) cysteine and without AS.

Figure (S3) Charge state of observed peptides in the digests of three HLMS and three mitochondria.

References

- Achour, B., Russell, M.R., Barber, J., and Rostami-Hodjegan, A. (2014). Simultaneous Quantification of the abundance of several cytochrome P450 and Uridine 5'-Diphospho-Glucuronosyltransferase enzymes in human liver microsomes using multiplexed targeted proteomics. *Drug Metab. Dispos.* 42, 500–510.
- Alterman, M.A., Kornilayev, B., Duzhak, T., and Yakovlev, D. (2005). Quantitative analysis of cytochrome P450 isozymes by means of unique isozyme-specific tryptic peptides: a proteomic approach. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 33, 1399–1407.
- Avadhani, N.G., Sangar, M.C., Bansal, S., and Bajpai, P. (2011). Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals: Concept of chimeric signals. *FEBS J.* 278, 4218–4229.
- Bièche, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., Beaune, P., and de Waziers, I. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet. Genomics* 17, 731–742.
- De Bock, L., Colin, P., Boussery, K., and Van Bocxlaer, J. (2012). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of cytochrome 3A4 in human liver microsomes. *Talanta* 99, 357–362.
- Boja, E.S., and Fales, H.M. (2001). Overalkylation of a protein digest with iodoacetamide. *Anal. Chem.* 73, 3576–3582.
- Dennison, J.B., Jones, D.R., Renbarger, J.L., and Hall, S.D. (2007). Effect of CYP3A5 expression on vincristine metabolism with human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 553–563.
- Duan, X., Chen, X., Yang, Y., and Zhong, D. (2007). Precolumn derivatization of cysteine residues for quantitative analysis of five major cytochrome P450 isoenzymes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 3234–3244.
- Guengerich, F.P. (2004). Cytochrome P450: What have we learned and what are the future issues? *Drug Metab. Rev.* 36, 159–197.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2509–2514.

- Hoffmann, E. de, and Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications* (Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: J. Wiley).
- Huang, H.-J., Tsai, M.-L., Chen, Y.-W., and Chen, S.-H. (2011). Quantitative shot-gun proteomics and MS-based activity assay for revealing gender differences in enzyme contents for rat liver microsome. *J. Proteomics* 74, 2734–2744.
- Huber, M., Bahr, I., Krätzschmar, J.R., Becker, A., Müller, E.-C., Donner, P., Pohlenz, H.-D., Schneider, M.R., and Sommer, A. (2004). Comparison of proteomic and genomic analyses of the human breast cancer cell line T47D and the antiestrogen-resistant derivative T47D-r. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 43–55.
- Jenkins, R.E., Kitteringham, N.R., Hunter, C.L., Webb, S., Hunt, T.J., Elsby, R., Watson, R.B., Williams, D., Pennington, S.R., and Park, B.K. (2006). Relative and absolute quantitative expression profiling of cytochromes P450 using isotope-coded affinity tags. *Proteomics* 6, 1934–1947.
- Jia, N., Liu, X., Wen, J., Qian, L., Qian, X., Wu, Y., and Fan, G. (2007). A proteomic method for analysis of CYP450s protein expression changes in carbon tetrachloride induced male rat liver microsomes. *Toxicology* 237, 1–11.
- Kamiie, J., Ohtsuki, S., Iwase, R., Ohmine, K., Katsukura, Y., Yanai, K., Sekine, Y., Uchida, Y., Ito, S., and Terasaki, T. (2008). Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm. Res.* 25, 1469–1483.
- Kawakami, H., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Suzuki, T., Abe, T., and Terasaki, T. (2011). Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *J. Pharm. Sci.* 100, 341–352.
- Knockaert, L., Fromenty, B., and Robin, M.-A. (2011). Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiopathological role in liver injury and obesity: Mitochondrial CYP2E1. *FEBS J.* 278, 4252–4260.
- Kremers, P., Beaune, P., Cresteil, T., De Graeve, J., Columelli, S., Leroux, J.-P., and Gielen, J.E. (1981). Cytochrome P-450 monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* 118, 599–606.
- Lane, C.S., Wang, Y., Betts, R., Griffiths, W.J., and Patterson, L.H. (2007). Comparative cytochrome P450 proteomics in the livers of immunodeficient mice using ¹⁸O stable isotope labeling. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 953–962.
- Langenfeld, E., Zanger, U.M., Jung, K., Meyer, H.E., and Marcus, K. (2009). Mass spectrometry-based absolute quantification of microsomal cytochrome P450 2D6 in human liver. *Proteomics* 9, 2313–2323.
- Lewis, D.F. (2004). 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 5, 305–318.
- Liao, W.-L., Heo, G.-Y., Dodder, N.G., Pikuleva, I.A., and Turko, I.V. (2010). Optimizing the conditions of a multiple reaction monitoring assay for membrane proteins: quantification of cytochrome P450 11A1 and adrenodoxin reductase in bovine adrenal cortex and retina. *Anal. Chem.* 82, 5760–5767.

- Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S., and Satoh, T. (2003). Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 123, 369–375.
- Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Ishiguro, N., Kishimoto, W., Ludwig-Schwellinger, E., Ebner, T. and Terasaki, T. (2012). Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: omparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab. Dispos.* 40, 83–92.
- Ortiz de Montellano, P.R. (2005). *Cytochrome P450 structure, mechanism, and biochemistry* (New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers).
- Pailleux, F., and Beaudry, F. (2012). Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 26, 881–891.
- Paine, M.F. (2006). The human intestinal cytochrome P450 “PIE.” *Drug Metab. Dispos.* 34, 880–886.
- Roos, P.H., Venkatachalam, A., Manz, A., Waentig, L., Koehler, C.U., and Jakubowski, N. (2008). Detection of electrophoretically separated cytochromes P450 by element-labelled monoclonal antibodies via laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1135–1147.
- Seibert, C., Davidson, B.R., Fuller, B.J., Patterson, L.H., Griffiths, W.J., and Wang, Y. (2009). Multiple-approaches to the identification and quantification of cytochromes P450 in human liver tissue by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 8, 1672–1681.
- Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Dumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Terasaki, T., and Scherrmann, J.-M. (2011). Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol. Pharm.* 8, 1332–1341.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., and Guengerich, F.P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 414–423.
- Shrivas, K., Mindaye, S.T., Getie-Kehtie, M., and Alterman, M.A. (2013). Mass spectrometry-based proteomic analysis of human liver cytochrome(s) P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267, 125–136.
- Snawder, J.E., and Lipscomb, J.C. (2000). Interindividual variance of cytochrome P450 forms in human hepatic microsomes: correlation of individual forms with xenobiotic metabolism and implications in risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 32, 200–209.
- Sun, L., Zhang, Y., Tao, D., Zhu, G., Zhao, Q., Wu, Q., Liang, Z., Yang, L., Zhang, L., and Zhang, Y. (2012). SDS-PAGE-free protocol for comprehensive identification of cytochrome P450 enzymes and uridine diphosphoglucuronosyl transferases in human liver microsomes. *Proteomics* 12, 3464–3469.
- Violette, A., Biass, D., Dutertre, S., Koua, D., Piquemal, D., Pierrat, F., Stöcklin, R., and Favreau, P. (2012). Large-scale discovery of conopeptides and conoproteins in the injectable

venom of a fish-hunting cone snail using a combined proteomic and transcriptomic approach. *J. Proteomics* 75, 5215–5225.

Wang, M.Z., Wu, J.Q., Dennison, J.B., Bridges, A.S., Hall, S.D., Kornbluth, S., Tidwell, R.R., Smith, P.C., Voyksner, R.D., Paine, M.F., et al. (2008). A gel-free MS-based quantitative proteomic approach accurately measures cytochrome P450 protein concentrations in human liver microsomes. *Proteomics* 8, 4186–4196.

Wang, Y., Al-Gazzar, A., Seibert, C., Sharif, A., Lane, C., and Griffiths, W.J. (2006). Proteomic analysis of cytochromes P450: a mass spectrometry approach. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1246–1251.

Williamson, B.L., Purkayastha, S., Hunter, C.L., Nuwaysir, L., Hill, J., Easterwood, L., and Hill, J. (2011). Quantitative protein determination for CYP induction via LC-MS/MS. *Proteomics* 11, 33–41.

Xu, M., Ju, W., Hao, H., Wang, G., and Li, P. (2013). Cytochrome P450 2J2: distribution, function, regulation, genetic polymorphisms and clinical significance. *Drug Metab. Rev.* 45, 311–352.

Yamazaki, H., Okayama, A., Imai, N., Guengerich, F.P., and Shimizu, M. (2006). Inter-individual variation of cytochrome P4502J2 expression and catalytic activities in liver microsomes from Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* 36, 1201–1209.

Yang, Z., and Attygalle, A.B. (2007). LC/MS characterization of undesired products formed during iodoacetamide derivatization of sulfhydryl groups of peptides. *J. Mass Spectrom.* 42, 233–243.

Yu, A.-M., Qu, J., Felmlee, M.A., Cao, J., and Jiang, X.-L. (2009). Quantitation of human cytochrome P450 2D6 protein with immunoblot and mass spectrometry analysis. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 170–177.

Zanger, U.M., and Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* 138, 103–141.

Zhang, H., Liu, Q., Zimmerman, L.J., Ham, A.-J.L., Slebos, R.J.C., Rahman, J., Kikuchi, T., Massion, P.P., Carbone, D.P., Billheimer, D., et al. (2011). Methods for Peptide and Protein Quantitation by Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.006593–M110.006593.

Table (1) Selected proteotypic peptides

CYP	Amino acid sequence
CYP2J2	VIGQGQQPSTAAR
CYP2D6	DIEVQGFR AFLTQLDELLTEHR
CYP3A4	EVTNFLR LSLGGLLQPEKPVVLK
CYP2C9	GIFPLAER
CYP3A5	LDTQGLLQPEKPIVLK DTINFLSK
CYP1A2	IGSTPVLVLSR YLPNPALQR

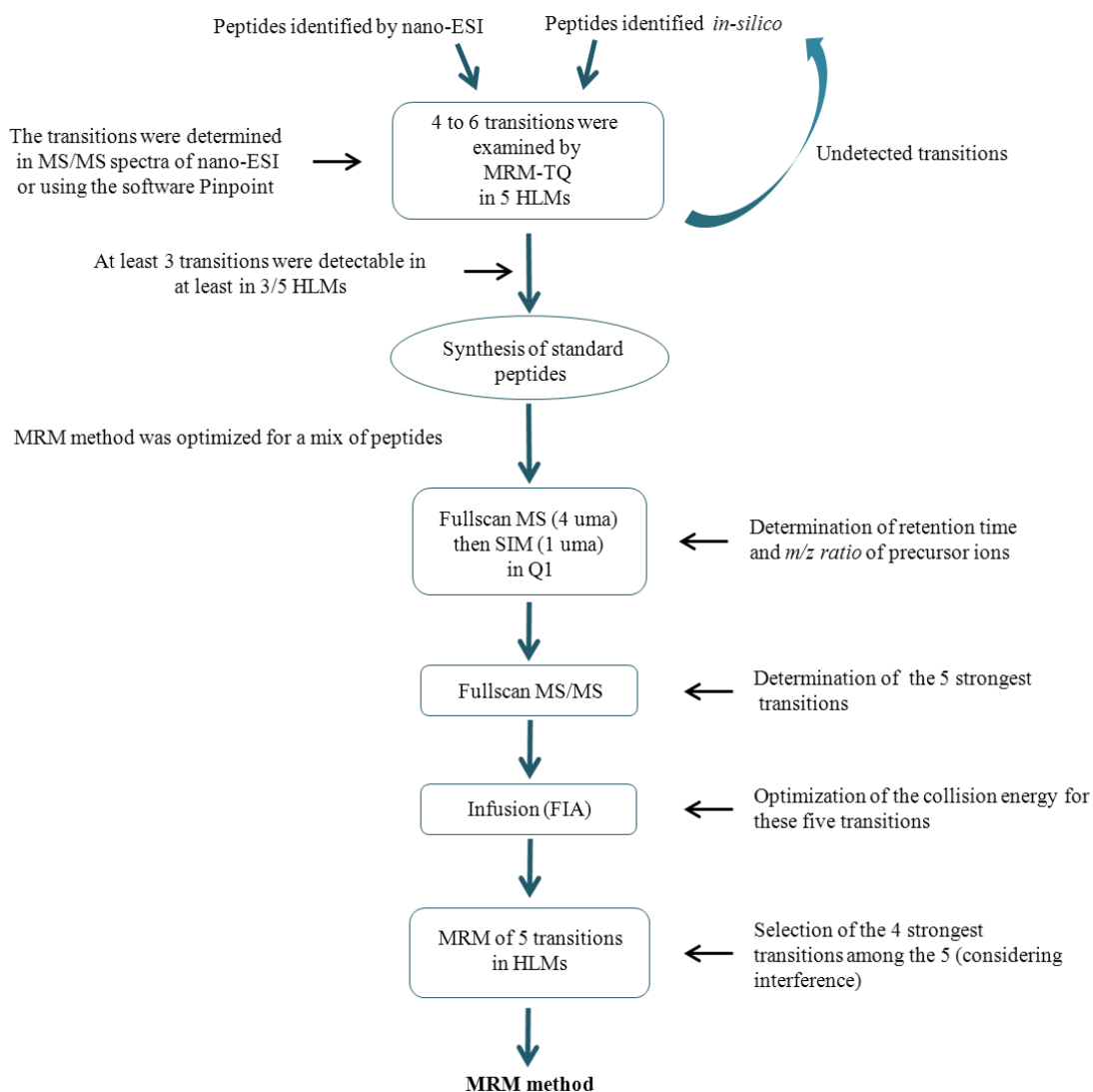


Figure (1) Selection strategy of proteotypic peptides and optimization of the MRM method.

Table (2) Final MRM method optimized for quantifying CYPs.

CYP	Peptide	<i>m/z</i> precursor	Type of fragment	<i>m/z</i> fragment	Scan time (ms)	Collision energy (eV)
CYP2J2	VIGQGQPSTAAR	[M+2H] ²⁺ 656.9	y ₆ ⁺	602.4	50	25
			y ₇ ⁺	730.4	50	23
			y ₉ ⁺	915.6	50	23
			y ₁₁ ⁺	1100.7	50	22
CYP3A4	EVTNFLR	[M+2H] ²⁺ 439.7	y ₁ ⁺	175.2	14	13
			y ₃ ⁺	435.3	14	14
			y ₄ ⁺	549.4	14	15
			y ₅ ⁺	650.3	14	15
CYP2C9	GIFPLAER	[M+2H] ²⁺ 451.7	F ⁺	120.3	14	22
			y ₃ ⁺	375.2	14	20
			y ₄ ⁺	488.3	14	20
			y ₅ ⁺	585.4	14	13
CYP2D6	DIEVQGFR	[M+2H] ²⁺ 482.2	a ₂ ⁺	201.1	14	17
			y ₄ ⁺	507.3	14	14
			y ₅ ⁺	606.4	14	15
			y ₆ ⁺	735.3	14	13
CYP1A2	IGSTPVLVLSR	[M+2H] ²⁺ 571.4	y ₇ ⁺	783.6	14	21
			y ₅ ⁺	587.4	14	22
			y ₄ ⁺	474.3	14	22
			y ₇ ²⁺	392.3	14	20
CYP3A5	LDTQGGLLQPEKPIVLK	[M+2H] ²⁺ 598.1	y ₁₅ ²⁺	840.4	14	17
			y ₁₂ ²⁺	668.2	14	16
			y ₁₄ ²⁺	782.8	14	17
			y ₆ ⁺	923.6	14	23
GF	EGVNDNEEGFFSAR	[M+2H] ²⁺ 785.9	y ₃ ⁺	333.2	14	24
			y ₄ ⁺	480.3	14	21
			y ₁₂ -NH ₃ ²⁺	684.5	14	25
			y ₇ ⁺	813.5	14	27

Glu-fibrinopeptide (GF) was used as an analytical standard (AS). Scan width = 1 Th, resolution parameter for Q1 and Q3: 0.7.

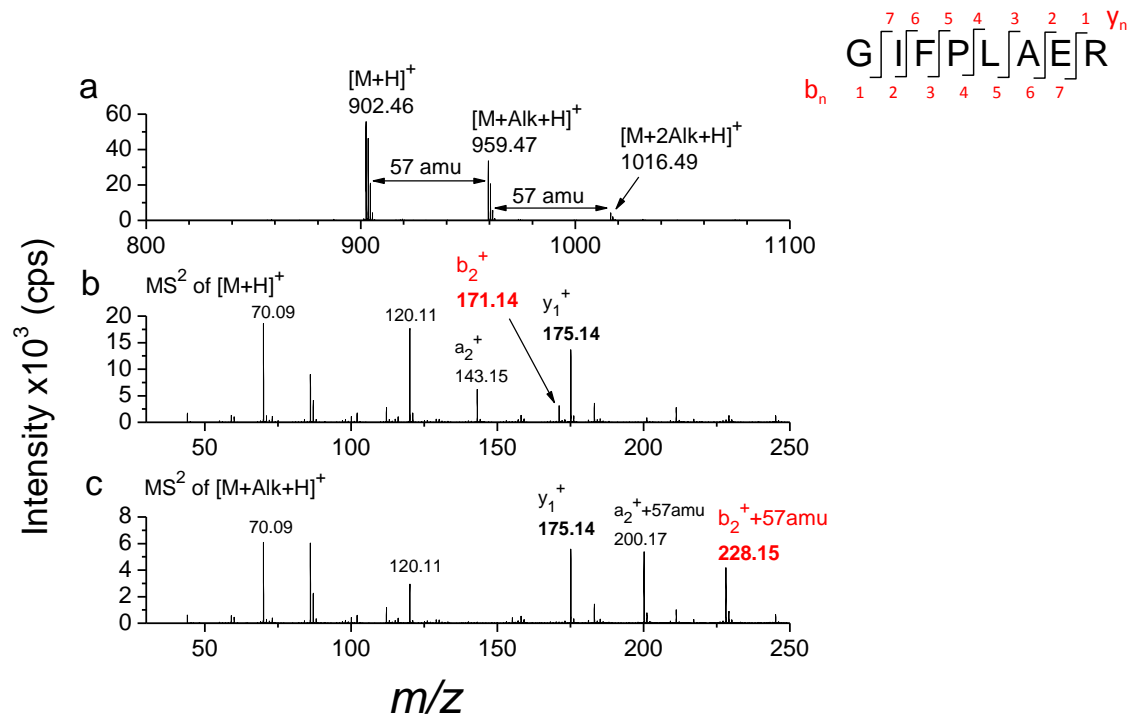


Figure (2) (a) MALDI analysis of the peptide GIFPLEAR (CYP2C9) incubated with IAA. (b) MS/MS spectrum of the native peptide ion $[M+H]^+$ at m/z 902.46 and (c) MS/MS spectrum of the $[M+H]^+$ ion (m/z 959.47) of the alkylated peptide.

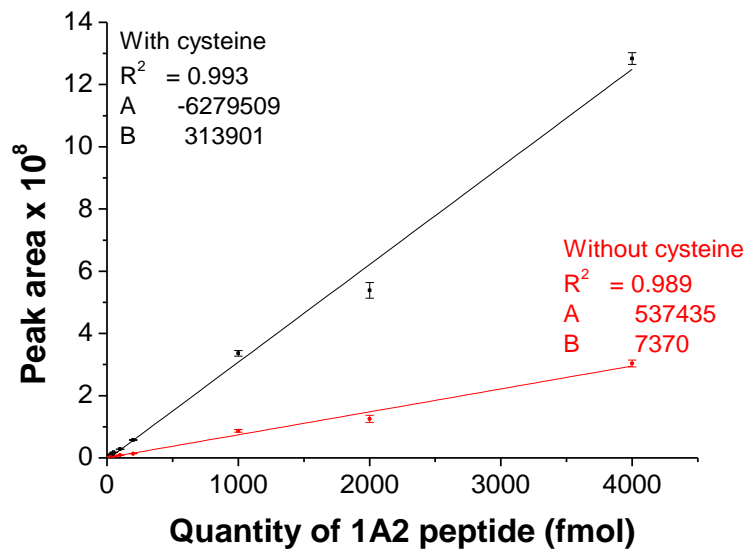


Figure (3) Calibration curve of the 1A2 peptide IGSTPVLVLSR in matrix (Mic_HepG2) with (black curve) and without (red curve) cysteine and without AS.

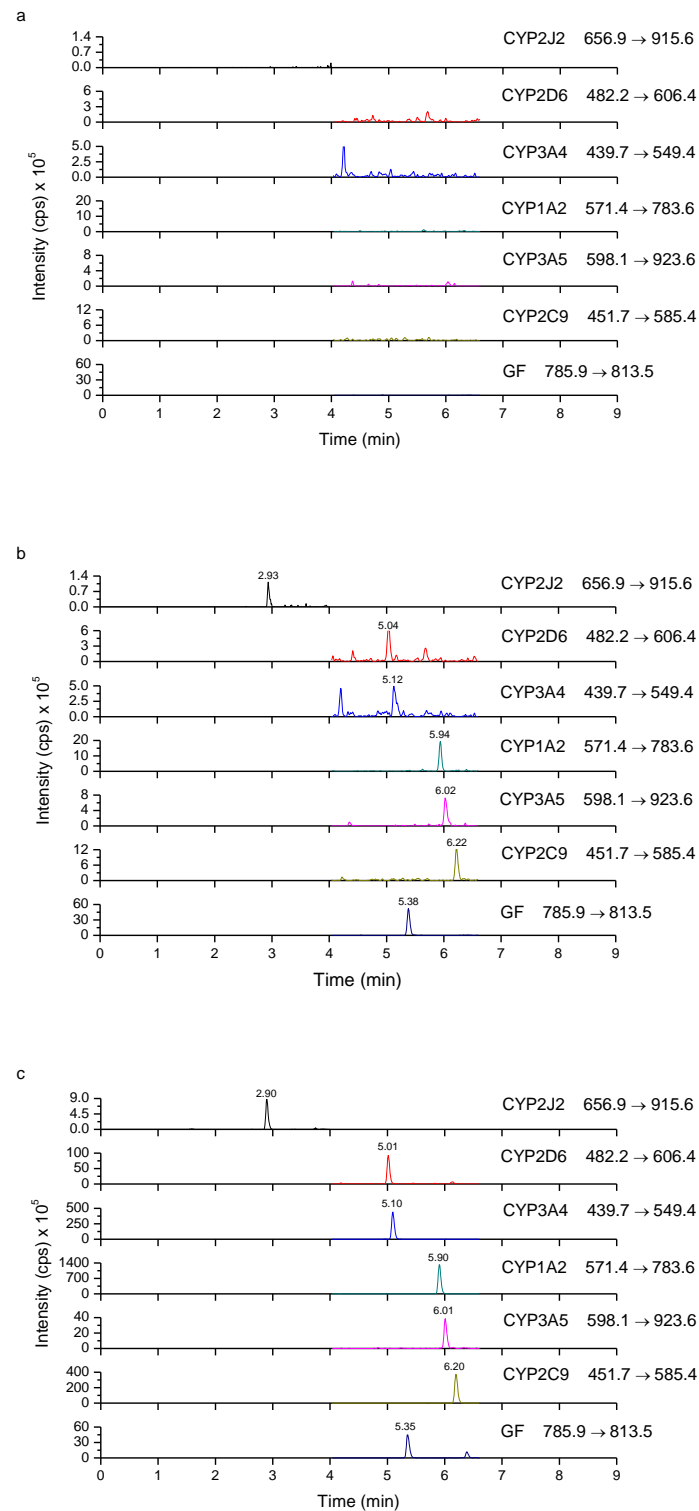


Figure (4) a) Extracted ion chromatogram of the strongest transition for each peptide in the matrix Mic_HepG2.

b) Extracted ion chromatogram of the strongest transition for each peptide at the limit of quantification (LOQ) value (25 fmol) except the 2J2 peptide VIGQGQQPSTAAR (12.5 fmol)

c) Extracted ion chromatogram of the strongest transition for each peptide in a digested HLM sample.

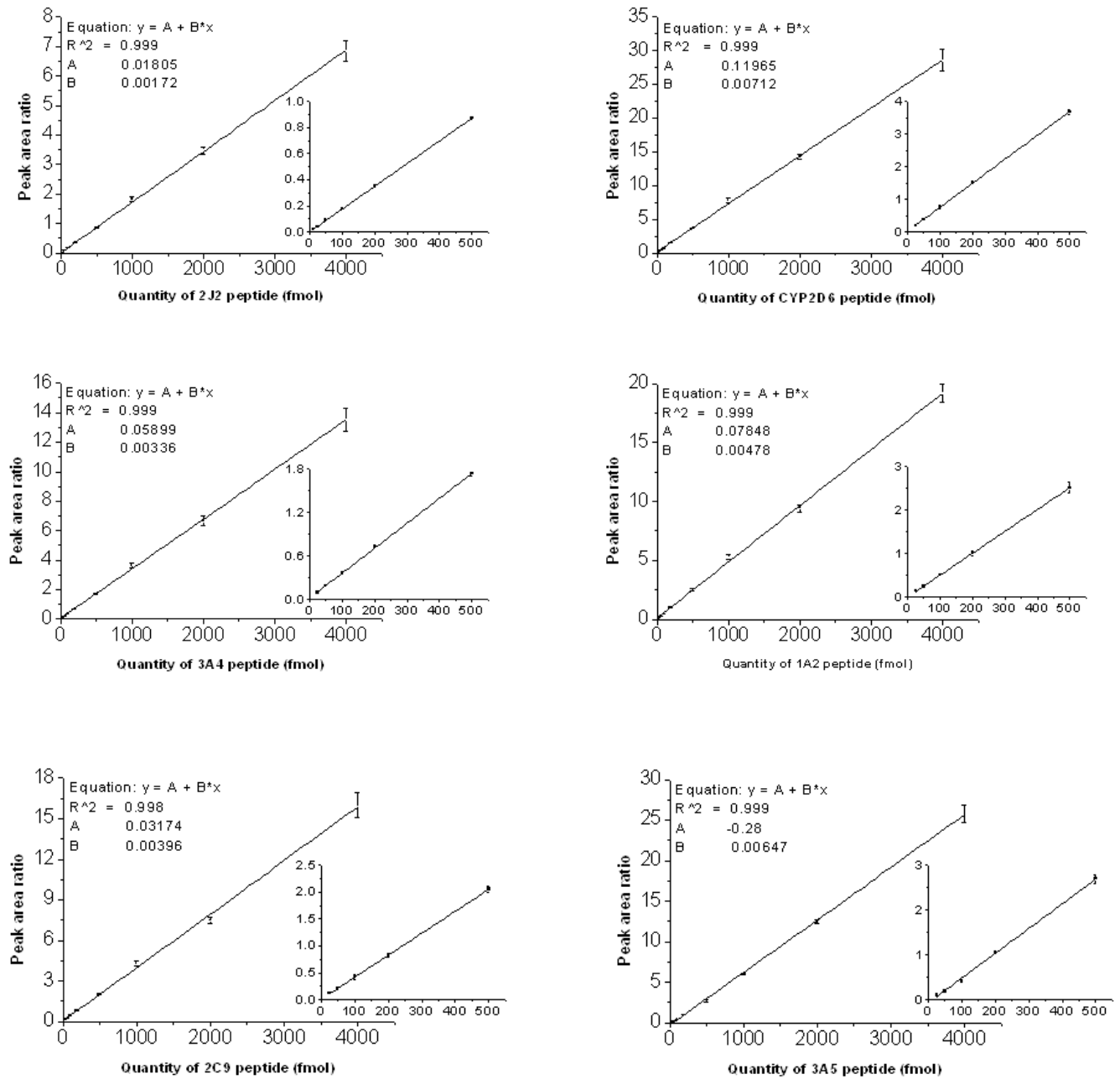


Figure (5) Calibration curves of standard peptides spiked in matrix prior digestion. Peak area ratios are ratio of peak areas of standard peptide to that of AS. Each data point represents average \pm standard deviation (S.D.) of data collected for the four MRM transitions.

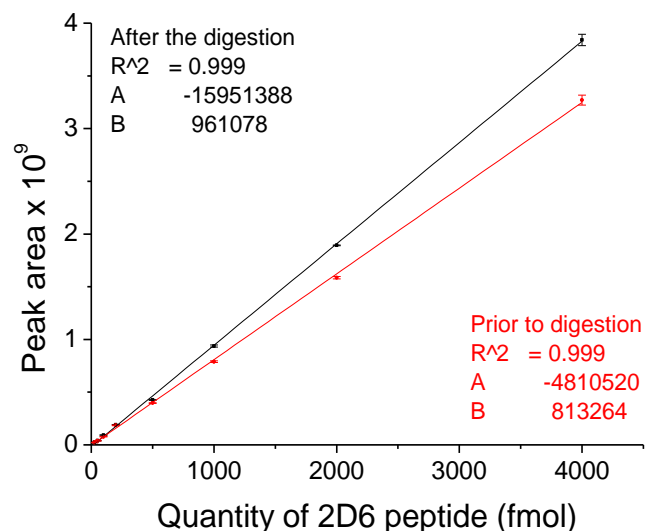


Figure (6) Calibration curves of the 2D6 peptide spiked in matrix prior (red curve) and after (black curve) the digestion step

Table (3) Dynamic range, linearity “equation $y=A+B*x$ ” and coefficient of variation (CV) values in different matrices. Each calibration point was injected in triplicate.

CYPs	Matrix	Dynamic range (fmol)	A	B	R ²	CV%
CYP2J2	Mic_HepG2	12.5 - 2000	0.00079	0.00174	0.999	1.4 - 3.7
	TH_HepG2	12.5 - 2000	0.01287	0.00143	0.999	1.3 - 5
	baculosome	50 - 2000	0.01500	0.00125	0.999	1 - 4.7
CYP2D6	Mic_HepG2	25 - 2000	0.02983	0.00733	0.999	2 - 7.8
	TH_HepG2	25 - 2000	0.06492	0.00668	0.999	0.5 - 5
	baculosome	50 - 2000	0.01833	0.00545	0.999	0.5 - 6
CYP3A4	Mic_HepG2	25 - 2000	0.02146	0.00343	0.999	1.2 - 9.8
	TH_HepG2	25 - 2000	0.03642	0.00308	0.999	0.4 - 4.8
	baculosome	50 - 2000	0.00517	0.00222	0.999	0.5 - 7.5
CYP1A2	Mic_HepG2	25 - 2000	0.00496	0.00501	0.999	3.2 - 5.4
	TH_HepG2	25 - 2000	-0.00225	0.00588	0.999	1.5 - 4.7
	baculosome	50 - 2000	-0.04474	0.00214	0.993	0.5 - 6.6
CYP3A5	Mic_HepG2	25 - 2000	-0.06479	0.00552	0.997	1.6 - 10.4
	TH_HepG2	25 - 2000	-0.12855	0.00621	0.998	1.2 - 9.4
	baculosome	50 - 2000	-0.27165	0.00527	0.991	0.4 - 3.6
CYP2C9	Mic_HepG2	25 - 2000	0.01058	0.00408	0.999	2.6 - 5.7
	TH_HepG2	25 - 2000	0.04156	0.00399	0.999	2.1 - 7.5
	baculosome	50 - 2000	-0.01234	0.00301	0.998	0.8 - 2.8

Table (4) Determination of interassay inaccuracy and precision in QC samples at three levels low QC (LQC), medium QC (MQC) and high QC (HQC) at 75, 500 and 1500 fmol, respectively.

CYP	Inaccuracy (Deviation %)			Precision (CV%)		
	LQC 75	MQC 500	HQC 1500	LQC 75	MQC 500	HQC 1500
CYP2J2	-4	-1	1	2	1.8	1.6
CYP2D6	-15	-10	-6	1.9	1.1	1.7
CYP3A4	-10	-7	-4	1.7	2.9	2.4
CYP1A2	-11	-6	-1	3.2	2.8	2.4
CYP3A5	-16	1	-9	4.2	1.7	2.5
CYP2C9	-15	-12	-10	2.6	2.7	2.5

Each data point represents the mean of 3 samples analyzed at 3 different days

Inaccuracy = (measured value – nominal value) / nominal value x 100

Precision = (SD of measured value / mean of measured value) x 100

Table (5) Stability of peptides in our experimental conditions.

CYP	Difference with freshly prepared sample (%)						
	-80°C (48h)		4°C (24h)				
	Mic	Mito	Mic	Mito	LQC 75	MQC 500	HQC 1500
CYP 2J2	1.5	-2.1	1.4	-1.1	-1.6	2.2	3.3
CYP 2D6	-3	-1.5	-5.8	-0.9	-5.8	3.4	5.9
CYP 3A4	2.1	-2.3	-4.8	1.8	-7.6	1.2	6
CYP1A2	-4.1	1.2	-3.5	-3.1	-4	2.8	4.7
CYP3A5	-1.4	-3.2	-2.2	-0.7	2.2	2.9	5.9
CYP 2C9	2.3	-0.8	-3.1	-1.1	-1.8	1.8	5.2

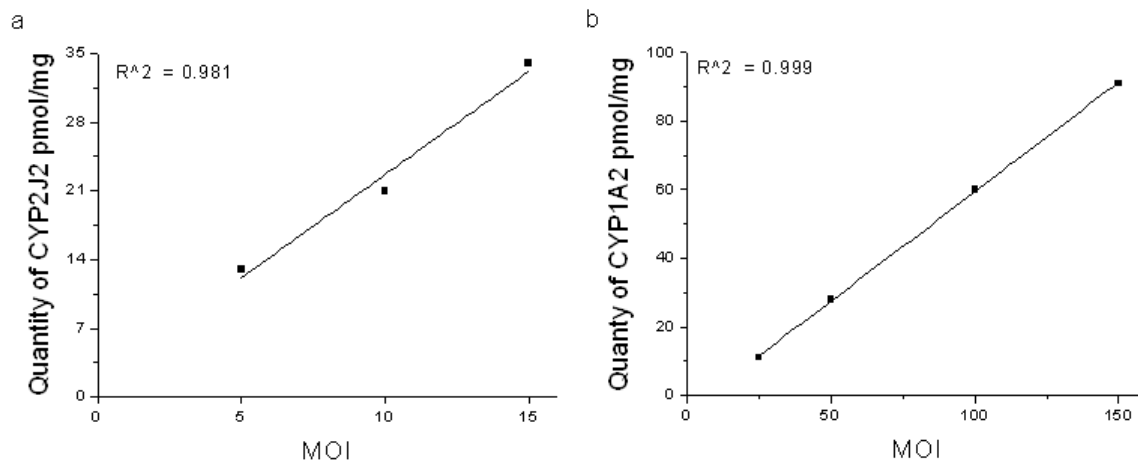


Figure (7) Quantities of recombinant CYPs 2J2 (a) and 1A2 (b), over-expressed in HepG2 cell line. MOI: Multiplicity of Infection.

Table (6) Quantity of 5 CYPs isoforms in HepG2 (GFP, and GFP_CYP) in pmol/mg protein (SD).

Sample	CYP2D6	CYP3A4	CYP1A2	CYP3A5	CYP2C9
HepG2_GFP	0	0	0	0	0
HepG2_GFP_CYP	82 (2)	38 (0.5)	5.5 (0.3)	18.5 (0.1)	22 (0.2)

SD: standard deviation

Table (7) Concentration of five recombinant CYPs measured by different techniques.

CYP	CYPs concentrations nmol/mg (SD)		Holoprotein/Total apoprotein %
	MRM method	Spectrophotometry method	
CYP3A4	1.33 (0.04)	0.95	71
CYP3A5	0.86 (0.03)	0.41	48
CYP2D6	0.48 (0.01)	0.11	23
CYP2C9	1.45 (0.01)	0.56	39
CYP1A2	0.63 (0.02)	0.11	18

Table (8) Quantity of 6 CYPs isoforms (Min-Max) in 5 HLMs in pmol/mg protein (first line) and the amounts found by WB and MS in different references.

CYP	Quantity pmol/mg Min-Max	Technique	Number of samples	Reference
1A2	39.3 - 93.7			This study
	3.62 - 278.7	WB	150	(Klein <i>et al.</i> , 2010)
	52 [‡]		119	(Rowland Yeo <i>et al.</i> , 2004)
	19 - 65	WB	60	(Shimada <i>et al.</i> , 1994)
	1.8 - 51.2	WB	36	(Guengerich and Turvy, 1991)
	15 - 45 [*]	WB		(Rodrigues, 1999)
	0.7 - 52.4	MS	11	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	3.3 - 65.5	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	165 - 263	MS	3	(Seibert <i>et al.</i> , 2009)
	2.9 - 103.9	MS	24	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
2D6	7.1 - 13.6			This study
	1 - 9	WB	60	(Shimada <i>et al.</i> , 1994)
	5 - 15 [*]	WB		(Rodrigues, 1999)
	8 [‡]		98	(Rowland Yeo <i>et al.</i> , 2004)
	0 - 33	WB	62 [‡]	(Stevens <i>et al.</i> , 2008)
	0 - 80	MS	30	(Langenfeld <i>et al.</i> , 2009)
	0.1 - 9.25	MS	11	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	6.2 - 36.4	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	0.1 - 62.4	MS	24	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
2C9	84.5 - 165.2			This study
	73 [‡]		174	(Rowland Yeo <i>et al.</i> , 2004)
	96 [*]	WB	Pool (n=12)	(Rodrigues, 1999)
	7.6 - 61.3	MS	11	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	40 - 115	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	17.2 - 139.1	MS	23	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
3A4	98.6 - 163.7			This study
	45 - 147 [§]	WB	60	(Shimada <i>et al.</i> , 1994)
	40 - 108 [*]	WB		(Rodrigues, 1999)
	10 - 130	WB	56	(Dennison <i>et al.</i> , 2007)
	9 - 322	MS	11,22	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
	0.6 - 28.1	MS	11	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	6.2 - 270	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	10.4 - 262.1	MS	24	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
3A5	4.3 - 54.4			This study
	0 - 89.4	WB	56	(Dennison <i>et al.</i> , 2007)
	1 [*]	WB	Pool (n=12)	(Rodrigues, 1999)
	0.2 - 34	MS	11,22	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
	0.1 - 3.2	MS	11	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	2.5 - 17.1	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	0.6 - 57.2	MS	23	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
2J2	2.8 - 5.6			This study
	6 - 20	WB	69 [‡]	(Gaedigk <i>et al.</i> , 2006)
	1 - 2 [§]	WB	49	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2006)
	Low abundance [#]	MS	3	(Seibert <i>et al.</i> , 2009)
	Low abundance	MS		(Sun <i>et al.</i> , 2012)
	0.3 - 2.9	MS	24	(Achour <i>et al.</i> , 2014)

* Mean of one (n=12) or three panels (n=12, 60, 60), [‡] Mean from a meta-analysis of data from 19 sources, [§] Values presented for 3A.

[‡] Samples >7 days-18 years, [‡] 51 prenatal (11.1 to 32 weeks) and 18 postnatal (5 days to 17 years) liver microsomal samples, [#] 0.6 - 1.5% of total identified CYPs.

[§] Mean of 20 Japanese and 29 Caucasian samples.

Table (9) Quantity of 6 CYPs isoforms (Min-Max) in mitochondria of 5 human livers in pmol/mg protein.

CYP	Quantity pmol/mg Min-Max
1A2	10.2 - 14.3
2D6	1.2 - 3.5
2C9	6.5 - 18.8
3A4	20.2 - 42.8
3A5	2.2 - 15.5
2J2	1.2 - 2.1

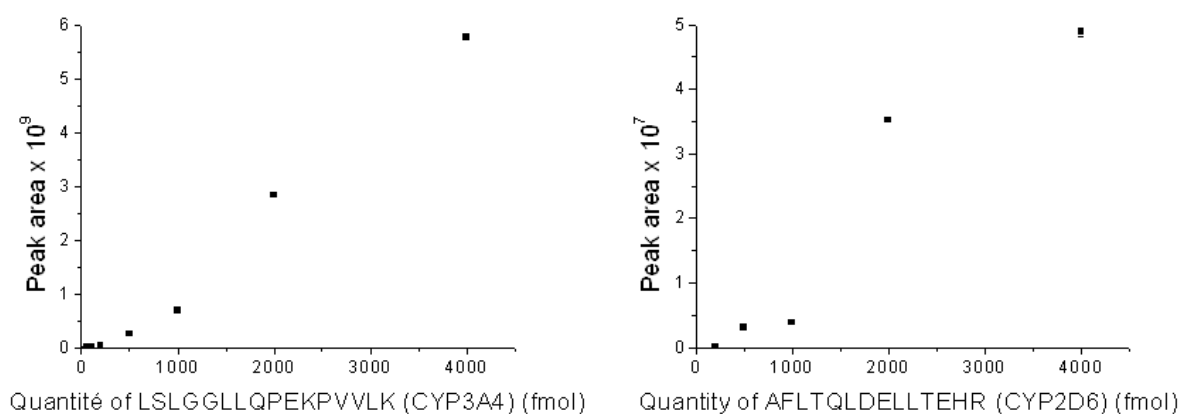


Figure (S1) Calibration curve of the LSLGGLLQPEKPVVLK (CYP3A4) peptide (LOQ=100 fmol) and AFLTQLDELLTEHR (CYP2D6) peptide (LOQ=200 fmol) in matrix (Mic_HepG2) prior to digestion with cysteine and without AS.

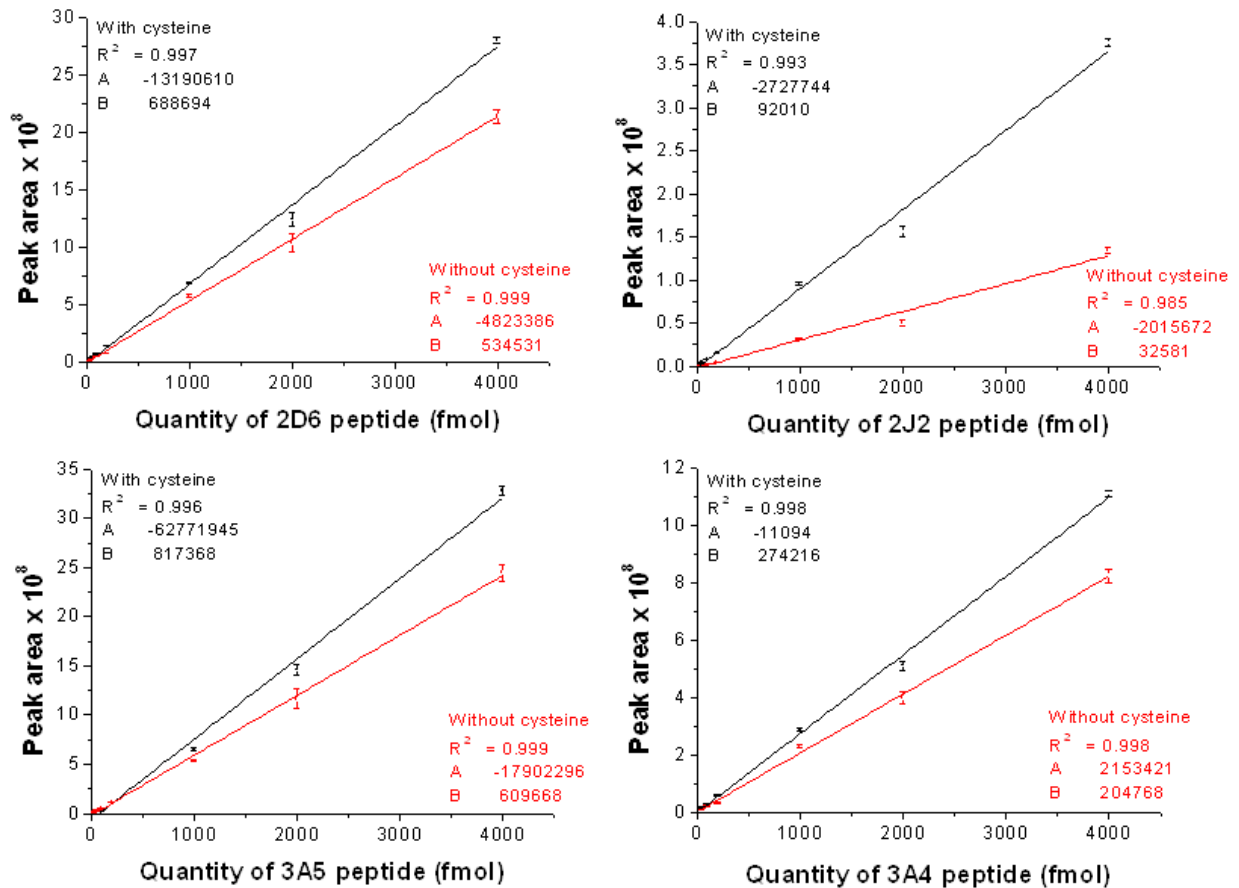


Figure (S2) Calibration curve of the (2J2, 2D6, 3A4 and 3A5) peptides in matrix (Mic_HepG2) with (black curve) and without (red curve) cysteine and without AS.

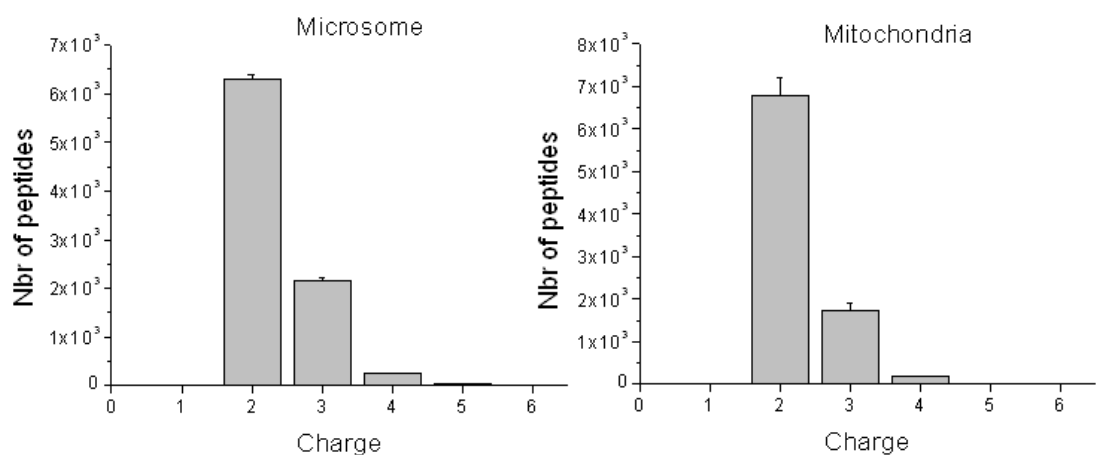


Figure (S3) Charge state of observed peptides in the digests of three HLMs and three mitochondria.

Table (S1) Peak area for each peptide in the digest of HLMs with and without cysteine.

Peptide	Peak area	
	Without Cysteine	With cysteine
2J2 peptide	1 306 833	2 307 047
2D6 peptide	14 337 933	28 845 025
3A4 peptide	80 701 053	124 294 873
1A2 peptide	4 430 495	17 749 254
3A5 peptide	98 242 187	120 461 930
2C9 peptide	4 709 300	25 262 173

Table (S2) Quantity of 6 CYPs isoforms in both microsomes (Mic) and mitochondria (Mito) of 5 human livers in pmol/mg protein (SD).

Sample	CYP2J2	CYP2D6	CYP3A4	CYP1A2	CYP3A5	CYP2C9
Mic_114	4.6 (0.1)	13.6 (0.5)	98.6 (1.5)	76.1 (1.5)	54.4 (0.5)	112.7 (2.2)
Mito_114	1.2 (0.1)	2.5 (0.1)	20.4 (0.4)	14.3 (0.3)	15.5 (0.4)	18.8 (0.5)
Mic_115	4.6 (0.2)	7.1 (0.3)	134.6 (5.8)	93.7 (4)	6.9 (0.3)	165.2 (9.2)
Mito_115	1.4 (0)	<LOQ	20.2 (0.7)	11.9 (0.2)	2.5 (0.1)	6.5 (0.3)
Mic_116	5.6 (0.2)	10.9 (0.4)	102.5 (5)	39.4 (1.1)	4.3 (0.1)	142.8 (6.2)
Mito_116	1.9 (0.1)	1.6 (0)	22.1 (0.8)	10.4 (0.6)	2.3 (0.1)	9.4 (0.6)
Mic_117	2.8 (0.2)	10.6 (0.2)	111.5 (1.3)	39.3 (1.2)	4.4 (0.1)	84.5 (1.1)
Mito_117	2.1 (0.1)	3.5 (0.2)	42.8 (2.1)	12.6 (0.7)	3 (0.1)	17.5 (1.1)
Mic_118	4 (0.1)	12.2 (0.7)	163.7 (5.2)	71.8 (2.2)	8.7 (0.4)	139.7 (4.7)
Mito_118	1.3 (0)	2.2 (0.1)	21 (0.4)	10.2 (0.5)	2.2 (0.1)	9.9 (0.1)

1.13.3 Conclusion

Le choix de la méthode développée, fait au début de cette thèse en fonction de la littérature, n'a pas pu prendre en compte les résultats publiés les plus récents, notamment sur le dosage de CYPs chez l'homme par spectrométrie de masse. Néanmoins ceux-ci n'ont pas apporté de changements importants de méthodologie.

1.13.3.1 Quantification des CYPs par des méthodes immunologiques

Le CYP3A4 dans 5 microsomes de foie d'enfants a été quantifié par ELISA en utilisant un anticorps premier qui reconnaît toute la protéine et qui est disponible dans le commerce (De Bock *et al.*, 2012). La méthode a été validée techniquement pour le 3A4 pour une gamme de concentration comprise entre 2 à 300 pmol/mg mais les résultats restent dépendants de la qualité de l'anticorps. Un test d'ELISA pour le CYP2E1 a été récemment mis au point par la même équipe (De Bock *et al.*, 2014)

1.13.3.2 Quantification des CYPs par spectrométrie de masse

Un grand nombre d'études a été réalisé ces 3 dernières années en utilisant la spectrométrie de masse.

a) Des quantifications relatives ont été réalisées en utilisant le marquage chimique et la méthode AQUA :

Le marquage chimique par diméthylation a été utilisé pour identifier et quantifier 21 CYPs dans les microsomes de rat dont 7 isoformes (CYPs 2C12, 2C11, 2C13, 2B3, 2C11, 2C70 et 3A2) sont dominants chez le mâle et 4 isoformes (CYP2A1, 2C7, 2C12 et 2D26) sont dominants chez la femelle (Huang *et al.*, 2011). La méthode AQUA-MRM a été utilisée pour quantifier relativement les CYPs 1A2, 2B6, 3A4 et 3A5 dans des microsomes d'hépatocytes traités par des inducteurs tels que le 3-méthylcholanthrène (3-MC), le phénobarbital (PB) et la rifampicine (RF) (Williamson *et al.*, 2011).

b) Des quantifications relatives ont aussi été réalisées en utilisant l'approche sans marquage :

Le mode MRM a été utilisé pour une quantification relative des membres des sous-familles 1A, 3A, 1E, 2C et 2D dans des microsomes de foie de souris contrôle et traitées par PB ou 3-MC (Moskaleva *et al.*, 2011). Les microsomes de foies de souris ont été analysés d'abord avec un appareil de type QTOF afin d'identifier les peptides protéotypiques et leurs fragments en mode MS/MS. Les fragments les plus intenses observés ont été recherchés en mode MRM avec 3 transitions par peptide avec un appareil de type TQ. Cette méthode donne les quantités relatives des CYPs analysés. L'approche sans marquage a été employée en utilisant le nombre de spectre (SC) pour quantifier relativement 27 CYPs dans des HLMs (Sun *et al.*, 2012) et en utilisant le nombre des peptide protéotypiques identifiés afin de quantifier relativement 30 CYPs dans 32 HLMs (Shrivastava *et al.*, 2013).

Ces méthodes avec ou sans marquage donnent des quantités relatives de CYPs entre deux échantillons ou deux conditions différentes. La quantité précise des CYPs dans le tissu ou le système d'expression hétérologue reste une question importante. Notre méthode, en profitant de l'avantage de l'approche sans marquage (simplicité et coût), est capable de répondre à cette question avec exactitude et précision (détaillé ci-dessous).

c) La méthode AQUA-MRM a été utilisée pour quantifier 7 CYPs dans les microsomes de foie et d'intestin de chien Beagle (4 individus) (Heikkinen *et al.*, 2012). Les CYPs quantifiés dans le foie sont : 1A2, 2B11, 2C21, 2D15, 2E1, 3A12 et 3A26 et les quantités sont de 48, 54, 35, 53, 52, 88 et 2 pmol/mg de protéine microsomale en moyenne, respectivement. Le CYP3A12 suivi par le CYP2B11, sont les plus abondants dans l'intestin mais en quantité moindre que dans le foie. Cette quantification a été effectuée sans gamme d'étalonnage.

d) Plusieurs études ont été réalisées en utilisant les méthodes AQUA, QconCAT et PSAQ en mode MRM afin de quantifier les CYPs dans le foie et le cerveau humain (Tableau 22 et 23).

Tableau (22) Méthodes de dilution isotopique réalisées pour quantifier les CYPs chez l'homme

Méthode	Type échantillon	Technique	CYP (pmol/mg)
AQUA (Kawakami <i>et al.</i> , 2011)	10 HLMS, pool foie humain	NanoLC-TQ MRM	11 CYPs ^a
AQUA (Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)	17 HLMS	NanoLC-QTRAP MRM	13 CYPs, POR ^b
AQUA (Shawahna <i>et al.</i> , 2011)	5 microvaisseaux cerveau humain	NanoLC-QTRAP MRM	2U1(0,44), 1B1 (0,45)
PSAQ (Liao <i>et al.</i> , 2011)	Rétine et cerveau humain	NanoLC-QTRAP MRM	46A1, 27A1 ^c
QConCAT (Achour <i>et al.</i> , 2014)	24 HLMS	NanoUPLC-TQ	13 CYPs ^d

^a, ^b et ^d sont présentés dans le (tableau 7), ^c La quantité de CYP46A1 est de 0,345 et 0,06 pmol/mg dans le cerveau et la rétine, respectivement. La quantité de CYP27A1 est de 0,11 et 0,49 pmol/mg dans le cerveau et la rétine, respectivement.

Tableau (23) Quantité en pmol/mg de protéines microsomales.

CYP	a	b	d
2C9	28,8 (20,6)	76,3 (26,6)	40 (26)
2E1	12 (5,2)	66,1 (27,4)	
3A4	8,89 (10,89)	60,4 (75)	68,1 (52,3)
2A6	6,39 (8,41)	56,2 (45)	62,8 (43,8)
2C8	11,1 (9,6)	30 (22,6)	18,9 (16,4)
1A2	11,2 (17,3)	25,1 (21,2)	29,4 (29,6)
4A11		21,8 (8,7)	
2D6	3,86 (3,42)	17,2 (8,4)	11,9 (13,2)
2B6	0,53 (0,23)	6,72 (3,19)	38,9 (46,8)
2C19	1,43 (2,47)	5,31 (5,2)	
3A43	0,52 (0,18)	4,1 (2,01)	0,35 (0,19)
3A5	0,8 (0,87)	3,86 (3,43)	14,2 (16,3)
3A7		2,4 (3,09)	7,6 (16,6)
POR		71,6 (17)	
2C18			0,4 (0,15)
2J2			1,2 (0,7)
4F2			11,9 (5,5)

Les valeurs présentent la moyenne calculée à partir de 10, 17 et 24 échantillons, pour ^a, ^b et ^d respectivement. L'écart type est présenté entre parenthèses (), POR : NADPH-CYP réductase.

Dans l'étude de Kawakami *et al.* (groupe de Terasaki), la méthode montre une bonne linéarité entre 10 à 5000 fmol. Le CV est inférieur à 20% pour les échantillons. Les auteurs ne mentionnent pas l'utilisation d'une matrice pour préparer les gammes. La groupe de Terasaki a aussi publié 3 études sur la quantification des CYPs dans des HLMS (Ohtsuki *et al.*, 2012), dans microvaisseaux de cerveau humain (Shawahna *et al.*, 2011) ainsi que sur culture primaire d'hépatocytes humains (8 CYPs) (Schaefer *et al.*, 2012). La validation de leur méthode a été détaillée dans une étude séparée (Sakamoto *et al.*, 2011). Les gammes des PP ont été préparées **hors matrice** avec une bonne linéarité entre 1 et 100 fmol. La méthode a montré une erreur relative (inaccuracy) entre 8,1 et 15,3% et une imprécision inférieure à 19% dans la matrice (HLMS). L'utilisation du couplage nano-LC rend cette méthode assez sensible (LOQ= 1 fmol) mais longue (1 heure par injection)

Pour la méthode QconCAT utilisée par Achour *et al.*, la linéarité de la méthode a été testée après préparation dans un extrait poolé de foie dilué (entre 1 et 32 fois). La précision de la méthode a été examinée sur 9 analyses (un échantillon de pool de foie digéré 3 fois et chaque préparation est injectée 3 fois). Cette méthode est laborieuse par rapport à notre méthode qui,

de plus, a été validée à l'aide d'une série de QC à trois niveaux et avec des gammes préparées dans une matrice biologique proche des microsomes humains.

En utilisant la méthode PSAQ, Liao *et al.* ont réussi à quantifier deux CYPs (46A1, 27A1) de faible abondance dans la rétine et cerveau humain. Les concentrations de protéine ont été calculées en multipliant le ratio léger et lourd par la quantité connue d'étalon interne ajouté avant la digestion. Ils n'utilisent pas de gamme et de plus l'utilisation d'une protéine marquée est laborieuse et coûteuse.

En comparant notre méthode avec les méthodes de dilution isotopique (AQUA, QconCAT et PSAQ) et malgré l'absence d'un étalon interne (IS) marqué, nous avons une méthode simple (standard et préparation), rapide (UPLC, acquisition de 16 min contre 1 heure en moyenne dans les autres études), moins onéreuse (réalisée sans IS marqué), avec une exactitude et précision de 16 et 5%, respectivement à la LOQ (1,25 fmol/mg sauf pour le CYP2J2 à 0,625 fmol/mg) ; nos exactitudes et précisions sont très similaires.

Nous avons donc développé et validé une méthode simple et rapide permettant de doser 6 CYPs dans des systèmes d'expression hétérologues (HepG2 et baculosomes). Cette méthode a été appliquée sur 5 foies humains (microsomes et mitochondries) en donnant des résultats comparables avec ceux de la littérature. Cette méthode sera appliquée sur 50 foies humains afin de déterminer l'expression de ces 6 CYPs dans les microsomes et les mitochondries. Ces données seront ensuite utilisées afin d'étudier la relation phénotype / génotype chez l'homme.

2. Applications biologiques dosage des CYPs chez l'Homme

2.1 Dosage dans le foie des CYPs 1A2, 2D6, 2C9, 2J2, 3A4 et 3A5 dans le foie humain

2.1.1 Introduction

Nous avons développé et validé une méthode de dosage de 6 CYPs, simple, rapide et applicable sur des échantillons biologiques.

Le fait de disposer d'une telle méthode est utile pour une meilleure connaissance de l'expression et de la régulation des CYPs. Elle peut également être utile pour doser des CYPs dans des outils de pharmaco-toxicologie (HLMs, hépatocytes, lignées cellulaires...). Ces dosages peuvent également être utiles dans le cadre du métabolisme et de la toxicologie

Afin d'étudier les relations phénotype/génotype des CYPs chez l'homme, cette méthode a été appliquée sur 50 foies humains. Les résultats ont ensuite été comparés avec les ARNm, l'activité et le séquençage de gènes.

Cette partie du travail n'est pas encore terminée. Nous avons choisi de la mettre en forme d'un article en attendant l'interprétation complète de tous les résultats

La partie «materials and methods » est la traduction de la section correspondante en français dans la thèse. Les sections de «materials and methods » qui ne sont pas déjà écrites dans la thèse sont indiquées par **

2.1.2 Projet de Publications 2

CYP measurement by mass spectrometry in human liver: genotype-phenotype relationships

2.1.2.1 Materials and methods

2.1.2.1.1 Reagents

Acetonitrile (ACN) (LC-MS grade Baker) was purchased from INTERCHIM (Montluçon, France). Formic acid (FA), trifluoroacetic acid (TFA), ammonium dihydrogencarbonate, iodoacetamide (IAA), the Dithiotreitol (DTT), sodium cholate, cysteine, NADPH, testosterone, trypsin "trypsin-type IX-S from porcine pancreas" are supplied by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Glass vials and inserts of 150µL were purchased from Waters (Guyancourt, France).

All peptides were synthesized by GenScript USA Inc (Piscataway Township, USA). Hepatocyte cell line HepG2 (ATCC® HB-8065™) (Molsheim, France) were grown in our laboratory (INSERM UMR-S1147). Human liver samples stored at -80°C were purchased from Kaly-Cell (Plobsheim, France).

Human CYPs (1A2, 2D6, 3A4, 3A5, 2C9 and 2J2) expressed baculosomes, used as standard for WB, were purchased from Gentest, BD Biosciences (Le Pont de Claix, France).

2.1.2.1.2 Human livers

Frozen human liver biopsy samples were purchased from Kaly-Cell (Plobsheim, France) and in accordance with French ethical guidelines. The samples (50 donors, age 60 ± 12 years) represent 31 men (age from 27 to 79 year, 4 drugs maximum and 5 smokers) and 19 women (age from 31 to 76 year, 5 drugs maximum and 5 smokers). Informations about the 50 donors are detailed in table (S1) in the supplementary data.

Table (S1) Donor demographics of liver biopsies. M: man (n=31), F: woman (n=19), age 60 ± 12 years.

No. Liver	Age (yr)	sex	Medical History	Drug	Observation
1	62	M	Cholangiocarcinoma	Unknown	Smoker, asthmatic
2	55	M	Cholangiocarcinoma	Unknown	Unknown
3	75	F	Cholangiocarcinoma	Levothyrox, Colopeg, Digoxine, Temerit, Fosamax	Hypertension
4	57	M	Colon adenocarcinoma	Tarteg, chemotherapy	Smoker, Hypertension
5	76	F	Cholangiocarcinoma	Lepticur, Abilify, Clomipramine	Hypertension
6	62	M	Cholangiocarcinoma	Unknown	Hypertension
7	77	M	Hepatocellular carcinoma	Gentamycine, Dalacine	Hypertension
8	68	M	Liver tumor-Chronic cirrhosis	Unknown	Unknown
9	54	M	Cholangiocarcinoma	Unknown	Hypertension
10	48	F	Cholangiocarcinoma	Nisisco, Lovenox	Hypertension
11	74	F	Cholangiocarcinoma	Primpéran, Athymil, Questran, théralène, Diffu-K	Smoker, Hypertension
12	43	F	Cholangiocarcinoma	Unknown	Unknown
13	50	F	Cholangiocarcinoma	Prozac, Neurotin, Noctran, Micardis	Hepatic & lung embolization
14	75	M	Hepatocellular carcinoma	Unknown	Radiotherapy & cervical polyps bladder
15	48	M	Pancreas adenocarcinoma	Unknown	Unknown
16	46	M	Urothelial cancer	Unknown	Unknown
17	63	M	Liver angioma	Unknown	Unknown
18	53	F	Colorectal adenocarcinoma	Seropram, Ixomil, Eupanthol, Mogadon	Smoker
19	38	M	Hepatic hydatid cyst	Unknown	Unknown
20	54	F	Wound of the biliary tree	Depakote, Ixel, Art 50	Unknown
21	56	F	Trauma	Unknown	Smoker, asthmatic
22	65	M	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Unknown
23	59	F	NC	Unknown	Unknown
24	66	M	Cholangiocarcinoma	Augmentin, Lasilix	Smoker, Hypertension

25	59	M	Epidermoid carcinoma, otorhinolaryngologic origin	Augmentin, Solupred	Unknown
101	74	M	HNF	Unknown	Unknown
102	56	F	Lung adenocarcinoma	Innohep, Tarceva, Doxy	Unknown
103	41	F	Hepatic angioma	Unknown	Unknown
104	27	M	Hepatic adenocarcinoma	Unknown	Smoker
105	66	F	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Smoker, alcoholic
106	60	M	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Unknown
107	58	M	NC	Unknown	Unknown
108	60	F	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Unknown
109	66	M	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Unknown
110	74	F	Sarcoma	Flagyl, Insuline, Gentamycine, Inipomp	Diabetes (II), Hypertension
111	72	M	NC	Unknown	Unknown
112	69	M	NC	Unknown	Unknown
113	59	M	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Hypertension
114	60	M	NC	Unknown	Unknown
115	79	M	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Hypertension
116	62	M	Hepatocellular carcinoma	Unknown	Hypertension
117	54	F	Endocrine tumor of pancreas	Lisinopril, Esomeprazole, Zolpidem	Smoker, Hypertension
118	64	M	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Hypertension
119	74	F	Colorectal adenocarcinoma	Unknown	Unknown
120	59	M	Hepatocellular carcinoma	Unknown	History Crohn's disease
121	56	F	Colorectal adenocarcinoma	Levothyrox, Amlodipine, Diffuk, Ogast	Hypertension
122	66	M	NC	Unknown	Unknown
123	79	M	Colorectal adenocarcinoma	Amlor, Aprovel, Allopurinol, Furosemide	Diabetes (II), Hypertension, Weaned on alcohol and tobacco
124	31	F	Gastrointestinal stromal tumor	Sutent, Zolpidem	Hart disease
125	62	M	Hepatocellular carcinoma	Unknown	Unknown

2.1.2.1.3 Sample preparation and protein measurement

Liver fractions (mitochondria and microsomes) were processed as described previously (article 1). Briefly, the liver fractions (mitochondria and microsomes) were prepared using differential centrifugation. Finally, they were suspended in sodium phosphate 100 mM, with (activity and western blot) or without (MS) protease inhibitor, and stored at - 80°C.

The microsomal fractions from HepG2 cell line (Mic_HepG2) were prepared as described for HLMics.

Total protein concentrations were measured using the bicinchoninic acid method (BCA protein assay kit) from Pierce -Thermo Scientific. Total CYPs were determined according to the carbon monoxide difference spectrum method (Omura and Sato, 1964).

Sample preparation for Mass Spectrometry

In-solution digestion was performed as described previously (article 1). Briefly, for the liver samples, 100 µg of microsomal or mitochondrial protein were mixed with equal volume of sodium cholate 4%. The samples were reduced and alkylated using dithiothreitol and iodoacetamide, respectively. Excess iodoacetamide was quenched with cysteine. Trypsin was finally added at an enzyme/substrate ratio of 2:100 for 16h at 37°C. After trypsinolysis, one step of acidification was performed to stop the digestion and eliminate the sodium cholate. The samples were centrifuged and the supernatant was separated, dried and stored at -80°C until analysis. For the calibration curves and the quality control samples (QC), the digestion of matrix (Mic_HepG2) was performed as described for the samples, except that 25 µg of protein were used. Standard peptides were added in the mixture, prior to the trypsin digestion step. Calibration curves were prepared with the following injected amounts (12.5, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 fmol) and QC samples were injected at 75, 500 and 1000 fmol of standard peptides. Before LC-MS/MS analysis, each sample was spiked with glu-fibrinopeptide, as an analytical standard (AS), in 50 µL of H₂O/ACN/FA (94/5/1 v/v/v). 10 µL of supernatant was injected.

2.1.2.1.4 LC-MS analyses

All digests were analyzed as described previously (article 1). Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Accela, TSQ Vantage, Thermo Fisher Scientific) was used. The chromatographic separation was performed with an octadecyl UPLC column (Acquity BEH130 C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm). The mobile phases were A (water, 0.1% FA) and B (ACN, 0.1% FA). The peptides were eluted at a flow rate of 350 µL/min, from 5 to 56% of B in 9 min. The mass spectrometer was programmed in multiple reaction monitoring (MRM) mode in the positive mode. Peak area integrations were performed using Xcalibur (2.0.7) software (Thermo Fisher Scientific).

2.1.2.1.5 Western Blot

Immunoblotting quantification of CYP (1A2, 3A4, 3A5, 2D6, 2C9 and 2J2) proteins in human liver fractions was performed using antibodies raised against the protein. Antibody production and characterization were previously described (Belloc *et al.*, 1996). Human recombinant CYPs expressed baculosomes (Gentest, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) were used as standards.

Samples (5 to 20 µg/lane of mitochondrial or microsomal protein) were denatured for 3 min at 100 °C in Laemmli buffer (60% glycerol, 2 M Tris pH 6.8, 10% SDS) (Laemmli, 1970), separated on 10% SDS-PAGE, and electrotransferred to membrane Hybond-C (GE Healthcare, Vélizy, France). The membrane is then blocked in phosphate buffer containing 0.1% Tween 20 and 0.2% I-block (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Dilutions of primary antibodies (1/10000 except for CYP3A5 1/5000) was then applied overnight at 4 °C. A second antibody conjugated with an enzyme (HRP) (Applied Biosystems), was applied (1/10000) and visualized using chemiluminescent substrate (ECL, GE Healthcare). Signals were revealed using charge-coupled device (CCD) camera (ImageQuant LAS 500) and logiciel (ImageQuant TL 8.1) (GE Healthcare).

2.1.2.1.6 Enzyme activity assays

2.1.2.1.6.1 P450-Glo™ Assays

Glo activities for CYPs 1A2, 3A4 and 2C9 were performed using the P450-Glo™ Assays kit (Promega, Charbonnières-les bains, France) according to the manufacturer's protocol. A 96 well plate is used. 5 µg of liver microsome protein (in duplicate + a control without NADPH) is combined with a suitable substrate (luciferin-1A2, luciferin-H and luciferin-IPA for CYPs 1A2, 2C9 and 3A4, respectively) in phosphate buffer potassium (KPO₄). The reaction was initiated by adding NADPH generating system and incubation at 37 °C was performed. A luminometer EnVision® (Perkin Elmer) was used to read the signal.

2.1.2.1.6.2 Testosterone 6β-Hydroxylation Assay (Determination of CYP3A4 activity)

For each HLMic sample, a triplicate and control were prepared. 10 µL (~25 µg of microsomal protein) were mixed with 190 µL of phosphate buffer (100 mM pH 7.4), 50 µL of solution A (26.1 mM NADPH, 66 mM glucose 6-P, 66 mM MgCl₂ in water) and 20 µL of solution B (40 U/mL glucose-6-P dehydrogenase in phosphate buffer pH 7.4). The control was mixed with 260 µL of phosphate buffer without solution A and B. The reaction was initiated with 30 µL of testosterone (500 µM) spiked in each tube (triplicate and control), and incubated at 37 °C for 30 min. The incubation is stopped by adding 500 µL of acetonitrile. A centrifugation step is performed at 10 000 g for 10 min. The supernatant is recovered and stored at -80 °C until the LC-MS analysis. On the day of analysis, 250 µL of supernatant was diluted with 235 µL of

acetonitrile and 15 μL of IS (2, 3, 4- $^{13}\text{C}_3$ -testosterone 3.43 μM in methanol). The samples were then dried and reconstituted with 100 μL of $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (3/2). 5 μL were injected. Standard curves were prepared in the same matrix as the samples. The LC-MS analysis was performed using UPLC coupled to a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Acquity, Synapt G2, Waters). The chromatographic separation was performed with an UPLC column (Acquity UPLC HSS T3 2.1 x 100 mm, 1.8 μm). The mobile phases were A (water, 0.1% FA) and B (ACN, 0.1% FA). The flow rate was 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, from 40 to 70% of B in 1.5 min (total time of 7 min). Experiments were achieved using an electrospray source in the positive mode with the following parameters: capillary voltage 750 V, source temperature 120 $^{\circ}\text{C}$, desolvation temperature 600 $^{\circ}\text{C}$, con gas flow 20 L/h and desolvation gas flow 900 L/h. Peak area integrations were performed using MassLynx[®] and QuanLynx[®] software (Micromass Waters).

2.1.2.1.7 Total RNA extraction, Reverse Transcription and Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from liver biopsies using the RNeasy micro Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. RNA quality was examined by 1.2% agarose gel electrophoresis (bioanalyser 2100, Agilent technologies, Les Ulis, France). The concentration and purity of purified RNA were determined by spectrophotometry at 260 nm using Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). The RNA samples were stored at -80 $^{\circ}\text{C}$ until use.

A reverse transcriptase reaction (RT) is performed to obtain the complementary DNA (cDNA) of the RNA. RNA was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Each sample (500 ng RNA) was mixed with the mix of reverse transcriptase, incubated for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and stored at -20 $^{\circ}\text{C}$.

All primers used for qRT-PCR are specific for studied genes (Bièche *et al.*, 2007) and marketed by Bioprédic International (Rennes, France). The qRT-PCR was performed using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions comprised an initial *Thermus aquaticus* polymerase activation step at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min, 40 cycles at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and a dissociation step to ensure the amplification of a single amplicon. For each sample, a reference gene TBP (TATA binding protein) is measured to control the variations in amount of RNA, and a cDNA pool (made by mixing 1 μL of all samples) was dosed on each plate to evaluate any variation between plates.

Gene expression was determined using the Ct value from each sample.

ΔCt = average Ct value for CYP - average Ct value for TBP gene, $\Delta\Delta\text{Ct}$ = ΔCt of a sample - ΔCt of a pool. CYP expression in each sample is expressed as % of the expression of CYP in the pool using the formula: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \times 100$.

2.1.2.1.8 CYP genes sequencing (MiSeq)**

Targeted resequencing was performed with a PCR multiplex method using a microfluidic support, the Access Array device from Fluidigm. At the end, PCR products from each sample corresponding to the different libraries were sequenced on a MiSeq Illumina Sequencer.

2.1.2.1.8.1 Primers Design

Primers pairs were designed with Integragen internal pipeline based on Primer3 and *In Silico* PCR and a tiling approach that resulted on a 2x coverage of the target region.

The 6 genes were thereby covered with 780 PCR of 281bp on average and a total of 183Kb considering all overlapped amplicons without primers.

One run of MiSeq 2x150b was planned by batch of 48 samples.

2.1.2.1.8.2 Management of the samples

Each sample was quantified with a fluorescent double strand method based on Sybr Green I.

The DNA sample was qualified if the double strand quantity was more than 1µg.

DNA samples were then purified by Agencourt AMPure XP kit, again quantified then normalized to engage precisely 250 ng on Access Array.

2.1.2.1.8.3 Management of Pools of primers

48 pools of primers pairs were created, each containing 47 to 48 different pairs. Each amplicon was present in 2 different pools whose combination is unique.

2.1.2.1.8.4 Library preparation and sequencing

Briefly, the protocol of library preparation was the following:

It was following the description of the Access Array User Guide (Access Array System for Illumina Platform User Guide_F1.pdf) with Integragen optimizations especially to increase the level of multiplexing.

The basic Access Array process enables the combination of 48 PCR with 48 samples giving 2304 independent PCR on the same device. We optimized the PCR mix that allowed us to perform 48 pools of 48 PCR for 48 samples i.e. a total of $48 \times 48 \times 48 = 110\,592$ PCR by Access Array or 2304 PCR by sample.

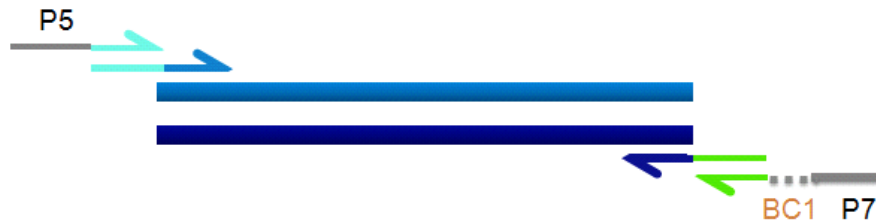
During the first PCR on Access Array, a universal tag, present on the 5' end of each primer pair (Rd1 Tag on forward primer and Rd2 Tag on reverse primer), was added at the end of each amplicon (see the molecular schema below).

■ **PCR1 on Acces Array: Locus specific primers and universal tags Rd1 et Rd2**

- Récupération de 48 pools (1 pool par échantillon)



■ **PCR2 on µplate: Addition of Illumina adapters P5 & P7 + sample barcodes (BC1)**



Following the thermo cycling of the Access Array on the BioMark, the Access Array was transferred in the Post-PCR IFC Controller AX allowing the recovery of the 48 pooled PCR for each sample.

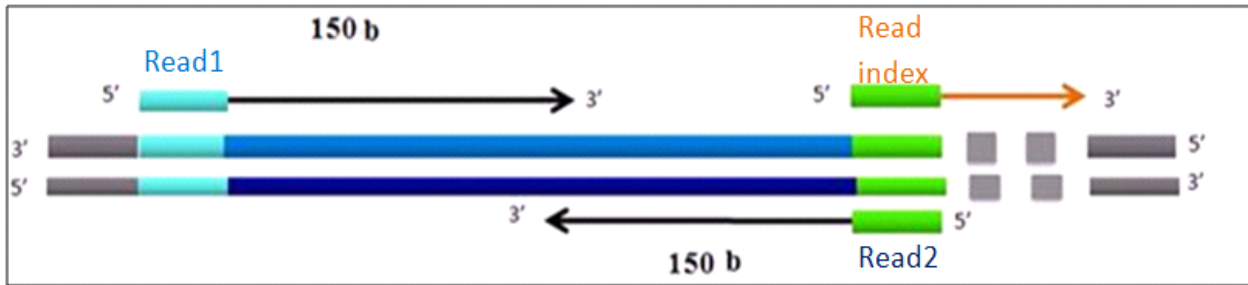
2 Access Array were used for amplifying the whole collection of the 96 samples.

The pooled PCR were then purified with AMPure XP beads from Agencourt and subjected to a second round of PCR for 6 cycles in a standard microplate format.

The universal tags added during the PCR1 were used during this PCR2 for amplification, with the appropriate universal primers (see schema above), and enabled the adding of specific barcodes to identify each sample during sequencing and adapters P5 and P7 for sequencing on the Illumina platform.

Each PCR were then controlled on Fragment Analyzer (AATI) and quantified to perform an equimolar pool of the 48 samples. This pool was again purified with AMPure and loaded on Fragment Analyzer to check the profile by comparing with the expected profile and the elimination of empty constructions around 150bp. The pool was finally quantified precisely by QPCR using P5 and P7 primers to engage the appropriate quantity for sequencing on the Illumina MiSeq system.

The MiSeq paired end 2x150b and index (barcode) sequencing (see schem below) was performed following Illumina recommendation with a V2 kit 300 cycles leading on 16.5 millions of passing filter clones.



2.1.2.1.8.5 Bioinformatics pipeline

The bioinformatics analysis of sequencing data is based on the Illumina pipeline (CASAVA1.8.2).

CASAVA performs alignment of a sequencing run to the reference sequence of each gene (hg19), calls the SNPs based on the allele calls and read depth, and detects variants (SNPs & Indels). The alignment algorithm used is ELANDv2 (performs multiseed and gapped alignments). Only the positions included in the targeted regions, i.e. exons \pm 20 nt, are conserved.

Genetics variation annotation is realized from IntegraGen in-house pipeline. It consists on genes annotation (RefSeq), known polymorphisms (dbSNP 131, 1000Genome) followed by a mutation characterization (exonic, intronic, silent, nonsense....).

For each position, the exomic frequencies (Homo & HTZ) are determined from all the exomes already sequenced at Integrangen, and the exome results provided by HapMap, 1000Genome, EVS.

We provide results per sample in tabulated text files. We also realize a coverage/depth statistical analysis for the targeted genes and exon per exon.

The results can be displayed in a genome browser like IGV or UCSC, from bam and bed files provided.

All the data can be visualized and filtered in ERIS (Exome Resequencing Intelligent Sorter), the web interface developed by IntegraGen (<http://eris.integrangen.com/>).

2.1.2.1.9 Statistical Analyses

Data distribution was tested by the method of Shapiro-Wilk; because most of data sets were not normally distributed, nonparametric methods (Mann-Whitney U test) were generally used for pair comparisons. The Pearson correlation coefficient (r) was calculated for normally distributed data, and the Spearman rank correlation coefficient (r_s) was calculated for data not normally distributed. Calculations were done using OriginPro (version 9.0.0, OriginLab Corporation, Northampton, MA, United States). Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

2.1.2.2 Results and discussion

The phenotypic results are gathered and analyzed in Tables 1- 5 and figure 1. Additionally, the raw data are also available as Supplementary Materials (S)

2.1.2.2.1 Presentation of the results

Table (S2) Raw data: DNA, RNA, protein and CYPs in 50 Human livers.

N° liver	DNA			mRNA	RQI	Protein	
	ng/μL	260/280	260/230			HLMics mg/mL	HLMits mg/mL
1	59.2	1.84	1.23	590.8	2.1	5.3	7.0
2	98.2	1.92	1.48	488.3	3.6	3.7	7.2
3	54.2	1.93	1.17	280.8	2.8	5.6	10.2
4	57.1	1.93	1.21	335.8	3.2	6.3	14.6
5	69.4	1.92	1.29	75.3	3.6	5.3	8.9
6	58.5	1.86	1.16	120.3	2.3	5.0	7.8
7	72.8	1.90	1.24	96.6	9.5	5.1	9.7
8	41.4	1.89	0.97	334.7	2.1	4.9	12.2
9	59.1	2.07	1.14	951.6	2.5	4.7	6.0
10	29.3	1.83	0.77	510.8	8.7	4.3	5.3
11	60.3	1.85	1.27	1313.0	7.9	5.4	9.6
12	37.0	1.88	0.90	169.9	8.2	3.1	8.4
13	32.3	1.85	1.52	588.9	7.9	2.7	5.6
14	35.0	1.83	1.77	659.5	3.0	4.3	7.2
15	140.8	1.98	1.64	544.2	3.3	3.3	9.9
16	53.2	1.86	1.14	298.9	7.5	7.8	13.0
17	54.9	1.92	1.17	285.3	8.2	10.7	9.7
18	47.1	1.91	1.07	234.1	7.5	6.0	8.6
19	38.4	1.80	0.96	489.6	6.3	5.5	10.6
20	84.9	1.89	1.42	297.4	8.3	16.0	7.1
21	25.3	1.84	0.76	393.2	6.5	3.8	15.3
22	37.1	2.01	0.92	180.5	3.4	3.6	5.0
23	60.0	1.90	1.17	1198.3	6.4	6.5	12.0
24	45.0	1.89	1.02	258.6	3.2	4.1	7.5
25	57.6	1.89	1.17	165.9	3.6	4.8	10.9
101	23.2	1.72	0.74	506.6	2.7	4.6	10.5
102	19.1	1.81	1.51	1186.0	7.2	8.3	8.6
103	98.8	1.81	1.40	414.1	3.4	5.7	7.4
104	68.8	1.86	1.01	342.0	3.2	4.2	8.0
105	51.7	1.84	1.24	329.0	7.5	5.8	10.7
106	23.6	1.87	0.74	201.3	6.0	4.2	6.9
107	89.8	1.86	1.50	191.1	3.6	4.2	8.3
108	38.0	1.67	0.74	426.2	6.5	4.6	5.5
109	46.3	1.74	1.06	239.4	7.1	6.5	10.6
110	44.5	1.78	1.02	498.3	3.3	6.3	10.4
111	43.6	1.80	1.06	225.7	4.2	2.7	5.8
112	42.6	1.77	0.77	1299.2	2.7	6.4	9.9
113	15.4	1.86	1.78	552.6	3.0	6.0	9.6
114	46.8	1.73	0.90	262.0	3.7	7.1	6.7
115	15.6	1.81	1.68	1045.2	2.8	6.3	10.2
116	32.8	1.92	0.88	1289.8	3.7	5.7	7.6
117	48.0	1.83	1.10	637.9	2.4	4.4	7.7
118	19.0	1.71	0.60	310.3	2.9	5.6	10.1
119	78.5	1.86	1.32	355.3	3.3	5.0	7.2
120	51.0	1.88	0.96	720.4	2.0	3.6	8.2
121	23.3	1.82	1.55	246.6	3.3	4.6	6.7
122	18.1	1.80	1.46	375.5	2.7	5.3	8.4
123	18.7	1.81	1.46	280.6	2.7	5.8	6.3
124	33.4	1.81	1.68	384.1	6.3	5.0	6.4
125	84.1	1.89	1.40	348.8	3.1	6.2	9.8
Mean	49.7	1.85	1.18	470.6	5.1	5.4	8.7
SD	24.9	0.07	0.30	325.8	2.3	2.1	2.3

* CYP concentrations were measured for HLMics only. RQI: RNA Quality Index, HLMics: microsomes, HLMits: mitochondria

Table (S3) Quantity of 6 CYPs in microsomes (HLMics) by MS in pmol/mg protein in 50 Human livers.

N° liver	CYP1A2		CYP2C9		CYP2D6		CYP2J2		CYP3A4		CYP3A5		Sum	CYPs*	MS/CYP
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD			
1	9.8	0.2	0	0	17.8	0.4	2.9	0	67	0.6	3.9	0.1	101.4	650	0.16
2	21.9	0.2	48.8	0.6	5.5	0.1	2.1	0	40.7	0.5	2.4	0	121.4	870	0.14
3	50.8	0.9	153.3	2.8	11.2	0.1	5.6	0.1	226.3	5.7	5.3	0.2	452.5	1020	0.44
4	50.4	1	99.1	0.9	22.5	0.7	3.8	0.1	57.9	0.7	4	0	237.7	660	0.36
5	40	1.3	19.2	0.4	2.3	0.1	3.1	0.1	65.6	2.2	3.9	0.1	134.1	400	0.34
6	12.1	0.2	5.5	0.1	12.1	0.5	1.9	0	35.3	0.8	36.7	0.7	103.6	500	0.21
7	19.8	0.6	8.1	0.1	26.4	0.9	3.4	0.1	35.7	0.7	7.2	0.2	100.6	540	0.19
8	37.6	1.2	112.5	3.7	11.6	0.2	3.6	0.1	57.5	0.8	3.7	0.1	226.5	330	0.69
9	21.9	0.4	13.6	0.6	8.2	0.2	2.7	0.1	37.7	1	6.1	0.1	90.2	640	0.14
10	9.5	0.2	60.8	0.9	10.7	0.16	2	0	33.4	1	3.7	0.16	120.1	330	0.36
11	47.3	1.7	99.3	2.3	11.1	0.3	4	0.1	117.5	2.4	5.8	0.3	285	570	0.50
12	48	2.2	184.2	1.4	2.3	0.1	3.7	0	97.1	0.5	3.2	0.2	338.5	510	0.66
13	8.7	0.5	7.6	0.4	6.5	0.14	1.2	0	25	1.7	1.7	0.1	50.7	790	0.06
14	41.3	0.2	243	3.1	17.6	0.2	6.2	0.1	72.1	0.2	4.5	0.1	384.7	650	0.59
15	12.5	0.2	4.3	0.3	12.7	0.1	2.4	0	42.6	0.6	3.7	0.1	78.2	240	0.33
16	80.8	2.5	121.3	2.9	29.3	1	5.2	0.1	139.3	4.9	6.1	0.2	382	790	0.48
17	58	2	170.4	4.1	11.4	0.2	3.9	0.1	115.6	2	5.4	1.2	364.7	860	0.42
18	225.8	5.9	221	2.4	21.1	0.6	9.1	0.1	271.7	4.4	9.1	0.1	757.8	1230	0.62
19	25.2	0.3	89.1	1.2	18.3	0.2	3.5	1.5	52.2	1.2	3.7	0.1	192	640	0.30
20	8.7	0.2	27.4	0.6	3.7	0.2	1.6	0.1	69.5	1.9	32.3	1	143.2	390	0.37
21	107.8	2.8	135.4	3.7	15.8	0.5	3.1	0	88.4	1.5	5.3	0	355.8	560	0.64
22	55.3	1.8	91.5	3.9	19.5	0.8	2.1	0.1	32.7	1.7	24.6	0.4	225.7	650	0.35
23	43.3	1.2	122	3.3	8.3	0.2	2.4	0	52.5	0.9	31.2	0.3	259.7	730	0.36
24	44.5	2.2	162.1	7.5	32.2	1.3	2.9	0.1	57.3	2.6	2.8	0.2	301.8	520	0.58
25	62.1	1.2	10.3	0.2	0	0	2.7	0	82.5	2.8	3.8	0.1	161.4	710	0.23
101	39.8	1.8	96.7	2.5	7.9	0.2	4.4	0.1	55	2	3.8	0.1	207.6	470	0.44
102	116.1	2.1	84.2	1.4	33.2	1	8.8	0.1	112.1	2.6	6	0.3	360.4	690	0.52
103	108.3	7.2	173.3	4.7	82.5	2.6	5	0.1	83.8	3.2	4.5	0	457.4	310	1.48
104	57.9	1.5	151.3	3.7	15.2	0.3	4.7	0.2	60.6	0.8	3.8	0.1	293.5	650	0.45
105	55.8	0.9	158.2	3.1	24.6	0.3	4.7	0.1	85.2	0.9	3.5	0.1	332	510	0.65
106	40.3	1.3	73.7	2.1	9.7	0.2	5.7	0.2	68.6	0.4	4.6	0	202.6	560	0.36
107	39.1	0.8	12.2	0.2	3	0.1	3.3	0.2	56.8	1.8	4.9	0.1	119.3	410	0.29
108	57.4	0.6	145.6	1.6	8.5	0	3	0	134.7	2.4	3.8	0.2	353	480	0.74
109	109.7	3.1	41.2	1.3	17.5	0.5	5.4	0.3	152.7	3.1	8.7	0.3	335.2	730	0.46
110	41.9	0.7	56.2	0.8	24.1	0.5	8.6	0.2	44.2	1.5	5.4	0.2	180.4	400	0.45
111	22	0.2	68.5	1	0	0	2.7	0	28.6	0.8	2.9	0.2	124.7	280	0.45
112	130.4	5.1	92.9	2.4	24.6	0.4	4.3	0.1	117.6	3.2	5.4	0.3	375.2	740	0.51
113	47.9	1.3	247.4	10.8	44.3	1	3.7	0.1	77.1	1.7	43	0.5	463.4	590	0.79
114	76.1	1.5	112.7	2.2	13.6	0.5	4.6	0.1	98.6	1.5	54.4	0.5	360	530	0.68
115	93.7	4	165.2	9.2	7.1	0.3	4.6	0.2	134.6	5.8	6.9	0.3	412.1	650	0.63
116	39.4	1.1	142.8	6.2	10.9	0.4	5.6	0.2	102.5	5	4.3	0.1	305.5	530	0.58
117	39.3	1.2	84.5	1.1	10.6	0.2	2.8	0.2	111.5	1.3	4	0.2	252.7	440	0.57
118	71.8	2.2	139.7	4.7	12.2	0.7	4	0.1	163.7	5.2	8.7	0.4	400.1	700	0.57
119	63.2	2.1	151.1	10.4	37.3	1.5	3.6	0.1	114.7	2	5.1	0.2	375	590	0.64
120	66.2	2.7	129.3	4.2	3.8	0.1	4.9	0.1	100.4	2	2.4	0	307	350	0.88
121	25.7	1.5	245.5	12	33.2	0.7	4	0.1	153.2	3.6	5.4	0.1	467	740	0.63
122	82.8	2	158.2	2.4	17.6	0.1	3.9	0.1	58.8	2.2	3.3	0.2	324.6	490	0.66
123	36.9	0.5	52	1.2	16	0.6	2.1	0	64	1.8	2.8	0.1	173.8	420	0.41
124	114.1	3	138.6	4.5	14.7	0.5	3.8	0.1	123	2	4.7	0.2	398.9	560	0.71
125	62.2	2.2	125.8	5.7	3.7	0.3	6.2	0.2	73.2	0	7.4	0.2	278.5	250	1.11
Mean	55.6		105.1		16.3		4.0		87.0		8.6		276.6	577	0.5
SD	38.9		66.7		13.7		1.7		48.9		11.1		135.3	192	0.2

* CYPs concentrations (pmol/mg protein) were measured by spectrophotometry for HLMics only.

Table (S4) Quantity of 6 CYPs in mitochondria (HLMits) by MS in pmol/mg protein in 50 Human livers. The quantification values <LOQ, were taken as 0 for calculating the mean.

N° liver	CYP1A2		CYP2C9		CYP2D6		CYP2J2		CYP3A4		CYP3A5	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1	2.4	0.1	4.7	0.1	2.1	0.1	0.8	0	10.2	0.7	1.2	0.1
2	3.1	0.2	5.6	0.3	1.5	0	0.6	0	11.9	0.4	1.5	0.1
3	8.5	0.2	30.5	0.9	1.3	0.1	1.1	0	36.1	0.9	2	0.1
4	8	0.4	17.6	0.7	3.2	0.1	0.8	0	10.2	0.3	1.5	0.1
5	10.9	0.2	14.3	0.6	0	0	1.5	0	19.8	0.8	1.7	0
6	2.3	0.1	7.4	0.1	2.6	0.1	0.7	0	5.6	0.2	9.9	0.4
7	6	0.1	23.1	0.3	4.9	0.1	1.2	0	7.2	0.4	1.8	0.1
8	8.7	0.7	18.9	1	2.3	0.1	0.9	0	14.6	0.6	1.9	0.3
9	5.2	0.2	4.3	0.1	1.7	0.1	1.2	0	10.6	0.3	2.7	0.2
10	2.1	0.1	5.2	0.1	4.6	0.2	1.3	0	18.9	0.4	1.8	0.1
11	10.5	0.1	32.8	0.1	1.7	0	1.2	0	25.8	0.4	2.3	0.1
12	13.2	0.5	36.6	2	0	0.1	1.5	0	31.8	1.2	2.1	0.1
13	3.8	0.2	14.8	0.1	2.9	0.1	1	0	12.8	0.5	1.7	0.1
14	7	0.1	25.8	0.4	3.4	0.2	1.8	0	15.9	0.3	1.8	0
15	4.2	0.1	8	0.1	2.6	0	0.9	0	13.1	0.3	1.7	0
16	16.1	0.2	18.1	0.4	2.6	0.1	1.4	0	25.4	0.2	2.2	0.2
17	8.4	0.4	23.2	1.4	0	0.2	0.8	0	17.5	2.1	1.7	0.1
18	29.5	0.8	32.1	0.1	2.6	0.1	1.4	0.1	34.6	0.3	2.2	0.1
19	1.2	0.1	2.7	0.3	5.3	0.3	1.2	0.1	8.7	0.7	<LOQ	-
20	1.8	0	3.3	0.2	0	0	0.8	0	18.7	0.3	11.6	0.5
21	21.9	0.4	19.3	0.6	2.6	0.1	0.7	0	18.8	0.3	1.7	0
22	11.7	0.3	4.4	0.2	6.8	0.2	1.3	0	12.7	0.3	9.2	0.4
23	9.2	0.1	18.2	0.3	0	0	0.9	0	14.3	0.2	9.2	0.2
24	12.9	0.3	32.6	1.4	9.3	0.4	1.3	0	19.5	1	1.6	0.1
25	11.4	0.2	6	0.1	0	0	1	0	15.1	0.5	1.4	0.1
101	6.2	0.2	5.5	0.3	1.2	0.1	1.7	0.1	5.2	0.4	1.5	0.1
102	4.2	0.2	2.2	0.2	4.1	0.3	1.8	0.1	11.1	0.3	1.9	0
103	9.1	0	12.9	0	16.4	0.3	1.6	0.1	17.3	0.3	1.8	0.1
104	8.8	0.1	5.4	0.2	1.8	0.1	1.5	0	9	0.3	1.8	0.2
105	8.8	0.2	12.9	0.5	3.7	0.2	2.1	0.1	17.7	0.7	2.2	0
106	8.2	0.2	4.7	0	1.9	0.1	2.3	0.2	16.1	1	2.3	0.2
107	0	0	0	0	<LOQ	-	0.6	0	4.4	0.2	2.1	0.1
108	8.8	0.1	13.6	0.6	1.9	0.1	1.4	0	38	0.3	2.5	0.1
109	17.3	0.5	5	0.1	2.6	0.1	1.4	0	27.1	0.2	3	0.1
110	2	0.1	0	0	2.9	0.1	1.7	0.1	2.5	0.1	1.9	0.1
111	10.5	0.2	19	0.5	0	0	1.9	0.1	14.4	0.6	2.7	0.3
112	4.5	0.1	3	0.2	3.1	0.1	1.2	0.1	20.4	0.5	2.1	0.1
113	9.6	0.5	33.7	0.9	9.7	0.4	1.5	0.1	17.6	0.6	17	0.4
114	14.3	0.3	18.8	0.5	2.5	0.1	1.2	0.1	20.4	0.4	15.5	0.4
115	11.9	0.2	6.5	0.3	<LOQ	0.1	1.4	0	20.2	0.7	2.5	0.1
116	10.4	0.6	9.4	0.6	1.6	0	1.9	0.1	22.1	0.8	2.3	0.1
117	12.6	0.7	17.5	1.1	3.5	0.2	2.1	0.1	42.8	2.1	3	0.1
118	10.2	0.5	9.9	0.1	2.2	0.1	1.3	0	21	0.4	2.2	0.1
119	11.7	0.4	16.6	0.5	5.7	0.1	1.1	0	22.9	0.6	2.3	0.1
120	15.1	0.7	16.1	0.4	<LOQ	-	1.8	0.1	24.5	0.6	1.6	0.1
121	3.2	0.1	21	0.9	5	0.1	1.4	0	26.5	1	2.5	0.1
122	25.3	0.3	45.8	1.7	5	0.2	1.7	0	22.7	0.9	2.7	0.2
123	2.8	0.1	<LOQ	-	3.5	0.1	0.6	0	11.7	0.3	1.5	0.1
124	28.2	1.1	19.4	1	3.3	0.2	1.8	0.1	35.9	0.5	3	0.1
125	9.5	0.3	4.4	0.1	0	0	1.6	0.1	13.5	0.3	2.6	0.1
Mean	9.5		14.3		2.9		1.3		18.3		3.2	
SD	6.5		11		3		0.4		9.0		3.5	

Table (S5) Quantity of 6 CYPs by WB in pmol/mg protein microsomal.

N° liver	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP2J2	CYP3A4	CYP3A5	Sum	CYPs*	WB/CYP
1	2.1	0.0	0.9	9.8	68.2	15.0	96	650	0.15
2	10.3	36.8	0.1	12.8	45.6	20.1	125.7	870	0.14
3	31.9	234.5	0.4	15.5	132.2	68.3	482.8	1020	0.47
4	20.6	142.3	1.4	14.5	59.0	58.3	296.1	660	0.45
5	9.6	130.0	0.0	13.0	71.4	65.6	289.6	400	0.72
6	5.8	147.6	1.3	2.8	107.5	33.2	298.2	500	0.60
7	6.1	345.4	9.8	3.9	109.0	35.3	509.5	540	0.94
8	8.3	104.0	0.4	2.9	111.6	126.1	353.3	330	1.07
9	6.5	65.4	1.0	2.6	71.0	139.8	286.3	640	0.45
10	2.7	43.5	1.3	2.7	69.8	123.9	243.9	330	0.74
11	8.7	92.7	2.8	1.3	91.8	28.9	226.2	570	0.40
12	6.6	98.9	1.5	1.1	86.3	50.7	245.1	510	0.48
13	0.0	26.5	1.4	2.0	31.1	10.3	71.3	790	0.09
14	4.5	113.2	1.5	4.6	72.1	33.3	229.2	650	0.35
15	0.8	27.4	0.7	2.9	52.7	24.3	108.8	240	0.45
16	15.3	87.1	0.1	<LOQ	83.2	54.0	239.7	790	0.30
17	8.0	134.5	0.0	<LOQ	178.2	50.1	370.8	860	0.43
18	24.9	137.2	0.1	2.5	260.8	137.5	563	1230	0.46
19	2.0	97.6	0.3	<LOQ	63.5	26.2	189.6	640	0.30
20	0.0	89.4	0.1	<LOQ	128.2	55.8	273.5	390	0.70
21	16.9	95.1	0.9	<LOQ	192.0	23.9	328.8	560	0.59
22	8.4	92.5	1.7	<LOQ	128.3	30.4	261.3	650	0.40
23	5.7	104.7	0.6	<LOQ	156.8	48.8	316.6	730	0.43
24	6.3	125.5	2.8	<LOQ	211.9	38.5	385	520	0.74
25	16.1	76.4	0.0	<LOQ	262.7	42.6	397.8	710	0.56
101	45.0	187.5	5.4	11.2	83.0	4.9	337	470	0.72
102	66.8	179.1	8.7	13.0	152.2	6.0	425.8	690	0.62
103	63.6	220.6	21.3	12.3	102.3	5.0	425.1	310	1.37
104	36.7	201.8	5.9	12.0	3.4	4.8	264.6	650	0.41
105	37.9	208.8	7.4	13.7	2.8	4.7	275.3	510	0.54
106	28.2	117.4	0.0	13.0	282.6	7.2	448.4	560	0.80
107		94.8		9.2	170.5	7.3	281.8	410	0.69
108	43.8	104.3	0.0	10.4	277.3	7.6	443.4	480	0.92
109	64.7	61.8	5.4	9.7	200.9	10.3	352.8	730	0.48
110	32.4	71.6	6.0	16.0	90.0	5.5	221.5	400	0.55
111	3.8	86.3	2.8	0.0	48.5	5.3	146.7	280	0.52
112	42.1	85.6	8.9	7.7	175.5	5.1	324.9	740	0.44
113	1.8	150.7	12.4	8.1	108.2	83.7	364.9	590	0.62
114	9.6	71.3	3.0	7.2	135.7	128.1	354.9	530	0.67
115	17.4	135.7	2.0	7.3	163.7	6.1	332.2	650	0.51
116	12.6	126.1	2.4	6.8	96.5	6.1	250.5	530	0.47
117	4.4	72.9	2.5	6.3	150.3	5.5	241.9	440	0.55
118	17.1	142.2	2.7	7.6	255.7	5.3	430.6	700	0.62
119	20.3	114.7	7.6	7.6	170.0	5.2	325.4	590	0.55
120		88.2		8.0	194.9	6.1	297.2	350	0.85
121	5.1	162.8	13.5	10.2	215.9	5.7	413.2	740	0.56
122	15.5	175.8	6.0	11.9	102.0	3.2	314.4	490	0.64
123	4.8	153.1	5.2	11.1	94.4	3.2	271.8	420	0.65
124	19.1	170.1	4.4	11.0	150.5	4.1	359.2	560	0.64
125	5.8	171.8	0.0	13.0	89.6	3.1	283.3	250	1.13
Mean	17.2	120.1	3.4	6.7	127.2	33.6	307.5	577.0	0.6
SD	17.3	60.2	4.3	5.3	69.1	38.6	102.5	192.0	0.2

* CYPs concentrations (pmol/mg protein) were measured by spectrophotometry for HLMics only. The quantification values <LOQ, were taken as 0 for calculating the mean.

Table (S6) Relative mRNA expression for 6 CYPs measured by qRT-PCR.

N° liver	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP2J2	CYP3A4	CYP3A5
1	51.94	252.43	225.96	170.61	146.56	107.89
2	20.81	57.39	27.00	44.78	60.27	65.80
3	37.95	107.72	78.05	113.68	232.08	53.63
4	169.14	171.43	132.23	158.28	100.07	72.77
5	126.94	97.29	54.41	141.09	105.22	129.37
6	9.83	83.90	66.74	60.63	21.63	165.93
7	119.13	102.39	126.85	142.95	39.24	86.72
8	200.52	961.07	544.36	324.56	522.16	130.18
9	80.92	316.53	138.41	146.78	152.72	60.58
10	58.83	83.81	70.83	89.88	105.47	94.44
11	73.42	108.35	80.63	74.80	151.21	116.22
12	112.29	59.48	31.99	80.37	130.62	45.62
13	44.80	61.12	78.48	114.11	42.09	46.60
14	94.54	275.62	103.99	306.40	278.63	122.05
15	22.19	119.47	122.41	737.78	109.47	127.59
16	97.02	99.75	99.36	147.64	180.75	89.50
17	402.45	130.84	177.65	168.22	274.40	69.95
18	125.12	54.27	40.31	105.83	131.86	46.15
19	70.34	138.41	343.67	120.22	78.45	168.61
20	38.91	98.47	73.43	124.92	103.72	185.06
21	11.29	8.17	26.63	21.32	5.79	4.61
22	365.37	181.72	284.08	120.23	65.55	183.60
23	353.52	251.38	279.25	266.94	45.36	216.15
24	47.38	124.06	202.88	47.55	63.50	247.20
25	139.00	275.75	203.40	135.84	144.91	219.52
101	48.03	942.86	1496.71	318.39	148.88	378.79
102	77.62	169.86	209.59	106.43	120.29	128.79
103	174.95	107.44	180.44	105.73	97.45	199.33
104	53.24	1106.94	1108.64	185.04	240.28	1020.39
105	74.17	41.24	54.00	82.46	72.23	104.86
106	60.51	261.15	282.15	195.63	133.97	200.57
107	180.86	155.55	161.40	202.36	181.49	192.81
108	135.46	144.23	139.91	136.34	146.03	113.32
109	323.06	129.00	170.20	202.41	275.85	164.36
110	28.70	99.29	75.12	67.93	112.42	88.97
111	54.82	213.48	64.42	148.26	61.52	107.89
112	271.12	277.13	182.75	222.85	487.11	483.50
113	17.06	100.78	94.36	51.55	52.82	129.09
114	156.45	202.22	421.11	151.77	85.17	187.44
115	66.71	988.79	985.91	142.14	154.25	485.67
116	134.55	246.40	250.96	195.38	177.81	194.71
117	110.70	2803.68	1159.34	326.95	1105.79	403.99
118	39.42	616.90	251.97	78.62	173.77	240.11
119	115.73	249.27	242.38	174.52	139.73	135.37
120	480.17	2720.63	996.52	407.78	3496.97	191.43
121	42.25	325.89	273.87	91.22	103.90	256.42
122	147.57	575.18	540.42	272.82	255.63	184.36
123	30.94	837.87	944.14	128.97	66.33	157.50
124	423.02	203.46	137.91	360.68	799.16	317.51
125	132.12	182.73	136.62	120.50	155.17	280.43
Mean	125.06	358.46	283.48	168.84	242.71	184.07
SD	113.55	557.21	333.83	118.49	501.79	158.48

Table (S7) Enzyme activity measured for 48 HLMics. Activity Glo_1A2 and MROD for CYP1A2, activity Glo_3A4 and 6 β testosterone for CYP3A4, activity () for CYP2C9 and activity Dextromethorphan for CYP2D6.

N° liver	CYP1A2	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	CYP3A4
	Glo	MROD	Glo		Glo	Testosterone
	pmol/min/mg	pmol/min/mg	pmol/min/mg		pmol/min/mg	pmol/min/mg
1	30	1.6	30		20	120
2	140	45	20		30	220
3	470	48	180		230	1060
4	50	0	30		20	80
5	30	1.8	10		30	140
6	10	0	10		10	60
7	120	8.5	100		30	220
8	290	72	30		40	250
9	210	62	130		40	260
10	100	25.1	40		30	190
11	150	35.9	20		40	220
12	300	40.9	90		80	410
13	10	0	10		10	60
14	50	4.2	60		30	220
15	30	2.4	10		30	210
16	470	137.3	40		90	540
17	350	49.1	90		90	480
18	400	32.4	100		90	670
19	160	24.4	10		20	110
20	30	1.1	20		50	150
21	720	70	70		80	520
22	390	123	50		30	220
23	210	25.6	40		40	210
24	140	23.3	50		40	280
25	480	122.3	40		30	500
101	270	106.5	60		30	370
102	450	123.2	60		30	370
103	490	114.3	80		30	300
104	300	75.1	60		20	280
105	180	22.9	70		30	360
106	40	21.4	20		20	180
107						
108	330	65.4	50		90	640
109	440	95.6	20		50	450
110	170	31.7	30		20	190
111	50	3.8	20		10	140
112	570	75.4	40		60	430
113	220	27.4	60		20	290
114	370	34.3	20		30	330
115	330	43.3	60		50	480
116	70	6.8	20		70	170
117	170	32.2	10		40	480
118	410	104.7	60		60	530
119	340	16.2	20		50	470
120						
121	150	11	90		90	590
122	480	41.3	50		20	230
123	200	28.9	40		30	200
124	310	28.4	30		50	400
125	430	99.5	70		40	340
Mean	252	45	48		45	325
SD	173	39	34		35	189

Table (S8) Quantity of protein (MS and WB), enzyme activity and mRNA expression for CYP1A2.

CYP1A2 N° Liver	Protein MS			WB pmol/mg HLMics	Activity Glo pmol/min/mg	Activity MROD pmol/min/mg	mRNA
	pmol/mg						
	HLMics	HLMits	HLMits/HLMics				
1	9.8	2.4	0.24	2.1	30	1.6	51.94
2	21.9	3.1	0.14	10.3	140	45	20.81
3	50.8	8.5	0.17	31.9	470	48	37.95
4	50.4	8	0.16	20.6	50	0	169.14
5	40	10.9	0.27	9.6	30	1.8	126.94
6	12.1	2.3	0.19	5.8	10	0	9.83
7	19.8	6	0.30	6.1	120	8.5	119.13
8	37.6	8.7	0.23	8.3	290	72	200.52
9	21.9	5.2	0.24	6.5	210	62	80.92
10	9.5	2.1	0.22	2.7	100	25.1	58.83
11	47.3	10.5	0.22	8.7	150	35.9	73.42
12	48	13.2	0.28	6.6	300	40.9	112.29
13	8.7	3.8	0.44	0.0	10	0	44.80
14	41.3	7	0.17	4.5	50	4.2	94.54
15	12.5	4.2	0.34	0.8	30	2.4	22.19
16	80.8	16.1	0.20	15.3	470	137.3	97.02
17	58	8.4	0.14	8.0	350	49.1	402.45
18	225.8	29.5	0.13	24.9	400	32.4	125.12
19	25.2	1.2	0.05	2.0	160	24.4	70.34
20	8.7	1.8	0.21	0.0	30	1.1	38.91
21	107.8	21.9	0.20	16.9	720	70	11.29
22	55.3	11.7	0.21	8.4	390	123	365.37
23	43.3	9.2	0.21	5.7	210	25.6	353.52
24	44.5	12.9	0.29	6.3	140	23.3	47.38
25	62.1	11.4	0.18	16.1	480	122.3	139.00
101	39.8	6.2	0.16	45.0	270	106.5	48.03
102	116.1	4.2	0.04	66.8	450	123.2	77.62
103	108.3	9.1	0.08	63.6	490	114.3	174.95
104	57.9	8.8	0.15	36.7	300	75.1	53.24
105	55.8	8.8	0.16	37.9	180	22.9	74.17
106	40.3	8.2	0.20	28.2	40	21.4	60.51
107	39.1	0	0.00				180.86
108	57.4	8.8	0.15	43.8	330	65.4	135.46
109	109.7	17.3	0.16	64.7	440	95.6	323.06
110	41.9	2	0.05	32.4	170	31.7	28.70
111	22	10.5	0.48	3.8	50	3.8	54.82
112	130.4	4.5	0.03	42.1	570	75.4	271.12
113	47.9	9.6	0.20	1.8	220	27.4	17.06
114	76.1	14.3	0.19	9.6	370	34.3	156.45
115	93.7	11.9	0.13	17.4	330	43.3	66.71
116	39.4	10.4	0.26	12.6	70	6.8	134.55
117	39.3	12.6	0.32	4.4	170	32.2	110.70
118	71.8	10.2	0.14	17.1	410	104.7	39.42
119	63.2	11.7	0.19	20.3	340	16.2	115.73
120	66.2	15.1	0.23				480.17
121	25.7	3.2	0.12	5.1	150	11	42.25
122	82.8	25.3	0.31	15.5	480	41.3	147.57
123	36.9	2.8	0.08	4.8	200	28.9	30.94
124	114.1	28.2	0.25	19.1	310	28.4	423.02
125	62.2	9.5	0.15	5.8	430	99.5	132.12
Mean	55.6	9.5	0.19	17.2	252.3	45.1	125.1
SD	38.9	6.5	0.09	17.3	173	39.3	113.5

MROD: Methoxyresorufin O-demethylation

Table (S9) Quantity of protein (MS and WB), enzyme activity and mRNA expression for CYP3A4.

CYP3A4 N° Liver	Protein MS			WB	Activity	Testosterone	mRNA	
	pmol/mg				Glo			pmol/min/mg
	HLMics	HLMits	HLMits/HLMics		pmol/min/mg			pmol/min/mg
1	67	12.8	0.19	68.2	20	119	146.56	
2	40.7	15.9	0.39	45.6	30	218	60.27	
3	226.3	13.1	0.06	132.2	230	1065	232.08	
4	57.9	25.4	0.44	59.0	20	79	100.07	
5	65.6	17.5	0.27	71.4	30	141	105.22	
6	35.3	34.6	0.98	107.5	10	57	21.63	
7	35.7	8.7	0.24	109.0	30	220	39.24	
8	57.5	18.7	0.33	111.6	40	252	522.16	
9	37.7	18.8	0.5	71.0	40	263	152.72	
10	33.4	12.7	0.38	69.8	30	185	105.47	
11	117.5	14.3	0.12	91.8	40	216	151.21	
12	97.1	19.5	0.2	86.3	80	407	130.62	
13	25	15.1	0.6	31.1	10	56	42.09	
14	72.1	10.2	0.14	72.1	30	221	278.63	
15	42.6	11.9	0.28	52.7	30	210	109.47	
16	139.3	36.1	0.26	83.2	90	538	180.75	
17	115.6	10.2	0.09	178.2	90	480	274.40	
18	271.7	19.8	0.07	260.8	90	672	131.86	
19	52.2	5.6	0.11	63.5	20	110	78.45	
20	69.5	7.2	0.1	128.2	50	152	103.72	
21	88.4	14.6	0.17	192.0	80	524	5.79	
22	32.7	10.6	0.32	128.3	30	223	65.55	
23	52.5	18.9	0.36	156.8	40	208	45.36	
24	57.3	25.8	0.45	211.9	40	282	63.50	
25	82.5	31.8	0.39	262.7	30	498	144.91	
101	55	5	0.09	83.0	30	365	148.88	
102	112.1	11.1	0.1	152.2	30	365	120.29	
103	83.8	17.3	0.21	102.3	30	300	97.45	
104	60.6	9	0.15	3.4	20	283	240.28	
105	85.2	17.7	0.21	2.8	30	365	72.23	
106	68.6	16.1	0.23	282.6	20	175	133.97	
107	56.8	4.4	0.08	170.5			181.49	
108	134.7	38	0.28	277.3	90	641	146.03	
109	152.7	27.1	0.18	200.9	50	455	275.85	
110	44.2	2.5	0.06	90.0	20	189	112.42	
111	28.6	14.4	0.5	48.5	10	136	61.52	
112	117.6	20.4	0.17	175.5	60	429	487.11	
113	77.1	17.6	0.23	108.2	20	291	52.82	
114	98.6	20.4	0.21	135.7	30	326	85.17	
115	134.6	20.2	0.15	163.7	50	476	154.25	
116	102.5	22.1	0.22	96.5	70	170	177.81	
117	111.5	42.8	0.38	150.3	40	485	1105.79	
118	163.7	21	0.13	255.7	60	533	173.77	
119	114.7	22.9	0.2	170.0	50	474	139.73	
120	100.4	24.5	0.24	194.9			3496.97	
121	153.2	26.5	0.17	215.9	90	587	103.90	
122	58.8	22.7	0.39	102.0	20	229	255.63	
123	64	11.7	0.18	94.4	30	204	66.33	
124	123	35.9	0.29	150.5	50	401	799.16	
125	73.2	13.5	0.18	89.6	40	342	155.17	
Mean	87.0	18.3	0.25	127.2	45	325	242.7	
SD	48.9	9.0	0.17	69.1	35	190	501.8	

Table (S10) Quantity of protein (MS and WB) and mRNA expression for CYP3A5. The quantification values <LOQ, were taken as 0 for calculating the mean.

CYP3A5 N° Liver	Protein MS			WB	mRNA
	pmol/mg			pmol/mg	
	HLMics	HLMits	HLMits/HLMics	HLMics	
1	3.9	1.1	0.28	15.0	107.89
2	2.4	1.5	0.63	20.1	65.80
3	5.3	2.0	0.38	68.3	53.63
4	4	1.5	0.38	58.3	72.77
5	3.9	1.7	0.44	65.6	129.37
6	36.7	9.9	0.27	33.2	165.93
7	7.2	1.8	0.25	35.3	86.72
8	3.7	1.9	0.51	126.1	130.18
9	6.1	2.7	0.44	139.8	60.58
10	3.7	1.8	0.49	123.9	94.44
11	5.8	2.3	0.4	28.9	116.22
12	3.2	2.1	0.66	50.7	45.62
13	1.7	1.7	1	10.3	46.60
14	4.5	1.8	0.4	33.3	122.05
15	3.7	1.7	0.46	24.3	127.59
16	6.1	2.2	0.36	54.0	89.50
17	5.4	1.7	0.31	50.1	69.95
18	9.1	2.2	0.24	137.5	46.15
19	3.7	<LOQ	-	26.2	168.61
20	32.3	11.6	0.36	55.8	185.06
21	5.3	1.7	0.32	23.9	4.61
22	24.6	9.2	0.37	30.4	183.60
23	31.2	9.2	0.29	48.8	216.15
24	2.8	1.6	0.57	38.5	247.20
25	3.8	1.4	0.37	42.6	219.52
101	3.8	1.5	0.39	4.9	378.79
102	6	1.9	0.32	6.0	128.79
103	4.5	1.8	0.4	5.0	199.33
104	3.8	1.8	0.47	4.8	1020.39
105	3.5	2.2	0.63	4.7	104.86
106	4.6	2.3	0.5	7.2	200.57
107	4.9	2.1	0.43	7.3	192.81
108	3.8	2.5	0.66	7.6	113.32
109	8.7	3.0	0.34	10.3	164.36
110	5.4	1.9	0.35	5.5	88.97
111	2.9	2.7	0.93	5.3	107.89
112	5.4	2.1	0.39	5.1	483.50
113	43	17.0	0.4	83.7	129.09
114	54.4	15.5	0.28	128.1	187.44
115	6.9	2.5	0.36	6.1	485.67
116	4.3	2.3	0.53	6.1	194.71
117	4	3.0	0.75	5.5	403.99
118	8.7	2.2	0.25	5.3	240.11
119	5.1	2.4	0.47	5.2	135.37
120	2.4	1.6	0.67	6.1	191.43
121	5.4	2.5	0.46	5.7	256.42
122	3.3	2.7	0.82	3.2	184.36
123	2.8	1.5	0.54	3.2	157.50
124	4.7	3.0	0.64	4.1	317.51
125	7.4	2.6	0.35	3.1	280.43
Mean	8.6	3.2	0.45	33.6	184.1
SD	11.1	3.5	0.18	38.6	158.5

Table (S11) Quantity of protein (MS and WB) and mRNA expression for CYP2J2. The quantification values <LOQ, were taken as 0 for calculating the mean.

CYP2J2 N° Liver	Protein MS			WB	mRNA
	pmol/mg			pmol/mg	
	HLMics	HLMits	HLMits/HLMics	HLMics	
1	2.9	0.8	0.28	9.8	170.61
2	2.1	0.6	0.29	12.8	44.78
3	5.6	1.1	0.2	15.5	113.68
4	3.8	0.8	0.21	14.5	158.28
5	3.1	1.5	0.48	13.0	141.09
6	1.9	0.7	0.37	2.8	60.63
7	3.4	1.2	0.35	3.9	142.95
8	3.6	0.9	0.25	2.9	324.56
9	2.7	1.2	0.44	2.6	146.78
10	2	1.3	0.65	2.7	89.88
11	4	1.2	0.3	1.3	74.80
12	3.7	1.5	0.41	1.1	80.37
13	1.2	1	0.83	2.0	114.11
14	6.2	1.8	0.29	4.6	306.40
15	2.4	0.9	0.38	2.9	737.78
16	5.2	1.4	0.27	<LOQ	147.64
17	3.9	0.8	0.21	<LOQ	168.22
18	9.1	1.4	0.15	2.5	105.83
19	3.5	1.2	0.34	<LOQ	120.22
20	1.6	0.8	0.5	<LOQ	124.92
21	3.1	0.7	0.23	<LOQ	21.32
22	2.1	1.3	0.62	<LOQ	120.23
23	2.4	0.9	0.38	<LOQ	266.94
24	2.9	1.3	0.45	<LOQ	47.55
25	2.7	1	0.37	<LOQ	135.84
101	4.4	1.7	0.39	11.2	318.39
102	8.8	1.8	0.2	13.0	106.43
103	5.0	1.6	0.32	12.3	105.73
104	4.7	1.5	0.32	12.0	185.04
105	4.7	2.1	0.45	13.7	82.46
106	5.7	2.3	0.4	13.0	195.63
107	3.3	0.6	0.18	9.2	202.36
108	3.0	1.4	0.47	10.4	136.34
109	5.4	1.4	0.26	9.7	202.41
110	8.6	1.7	0.2	16.0	67.93
111	2.7	1.9	0.7	0.0	148.26
112	4.3	1.2	0.28	7.7	222.85
113	3.7	1.5	0.41	8.1	51.55
114	4.6	1.2	0.26	7.2	151.77
115	4.6	1.4	0.3	7.3	142.14
116	5.6	1.9	0.34	6.8	195.38
117	2.8	2.1	0.75	6.3	326.95
118	4.0	1.3	0.33	7.6	78.62
119	3.6	1.1	0.31	7.6	174.52
120	4.9	1.8	0.37	8.0	407.78
121	4	1.4	0.35	10.2	91.22
122	3.9	1.7	0.44	11.9	272.82
123	2.1	0.6	0.29	11.1	128.97
124	3.8	1.8	0.47	11.0	360.68
125	6.2	1.6	0.26	13.0	120.50
Mean	4.0	1.3	0.37	6.7	168.8
SD	1.7	0.4	0.15	5.3	118.5

Table (S12) Quantity of protein (MS and WB), enzyme activity and mRNA expression for CYP2C9.

CYP2C9 N° Liver	Protein MS			WB	Activity	mRNA
					Glo	
	pmol/mg				nmol/min/mg	
	HLMics	HLMits	HLMits/HLMics	HLMics		
1	0	4.7	—	0.0	0.03	252.43
2	48.8	5.6	0.11	36.8	0.02	57.39
3	153.3	30.5	0.2	234.5	0.18	107.72
4	99.1	17.6	0.18	142.3	0.03	171.43
5	19.2	14.3	0.74	130.0	0.01	97.29
6	5.5	7.4	1.35	147.6	0.01	83.90
7	8.1	23.1	2.85	345.4	0.10	102.39
8	112.5	18.9	0.17	104.0	0.03	961.07
9	13.6	4.3	0.32	65.4	0.13	316.53
10	60.8	5.2	0.09	43.5	0.04	83.81
11	99.3	32.8	0.33	92.7	0.02	108.35
12	184.2	36.6	0.2	98.9	0.09	59.48
13	7.6	14.8	1.95	26.5	0.01	61.12
14	243	25.8	0.11	113.2	0.06	275.62
15	4.3	8	1.86	27.4	0.01	119.47
16	121.3	18.1	0.15	87.1	0.04	99.75
17	170.4	23.2	0.14	134.5	0.09	130.84
18	298.7	32.1	0.11	137.2	0.10	54.27
19	89.1	2.7	0.03	97.6	0.01	138.41
20	27.4	3.3	0.12	89.4	0.02	98.47
21	135.4	19.3	0.14	95.1	0.07	8.17
22	91.5	4.4	0.05	92.5	0.05	181.72
23	122	18.2	0.15	104.7	0.04	251.38
24	162.1	32.6	0.2	125.5	0.05	124.06
25	10.3	6	0.58	76.4	0.04	275.75
101	96.7	5.5	0.06	187.5	0.06	942.86
102	84.2	2.2	0.03	179.1	0.06	169.86
103	173.3	12.9	0.07	220.6	0.08	107.44
104	151.3	5.4	0.04	201.8	0.06	1106.94
105	158.2	12.9	0.08	208.8	0.07	41.24
106	73.7	4.7	0.06	117.4	0.02	261.15
107	12.2	0	0	94.8		155.55
108	145.6	13.6	0.09	104.3	0.05	144.23
109	41.2	5	0.12	61.8	0.02	129.00
110	56.2	0	0	71.6	0.03	99.29
111	68.5	19	0.28	86.3	0.02	213.48
112	92.9	3	0.03	85.6	0.04	277.13
113	247.4	33.7	0.14	150.7	0.06	100.78
114	112.7	18.8	0.17	71.3	0.02	202.22
115	165.2	6.5	0.04	135.7	0.06	988.79
116	142.8	9.4	0.07	126.1	0.02	246.40
117	84.5	17.5	0.21	72.9	0.01	2803.68
118	139.7	9.9	0.07	142.2	0.06	616.90
119	151.1	16.6	0.11	114.7	0.02	249.27
120	129.3	16.1	0.12	88.2		2720.63
121	245.5	21	0.09	162.8	0.09	325.89
122	158.2	45.8	0.29	175.8	0.05	575.18
123	52	<LOQ	—	153.1	0.04	837.87
124	138.6	19.4	0.14	170.1	0.03	203.46
125	125.8	4.4	0.03	171.8	0.07	182.73
Mean	106.7	14.5	0.29	120.1	0.05	358.5
SD	70.2	10.8	0.55	60.2	0.03	557.2

Table (S13) Quantity of protein (MS and WB), enzyme activity and mRNA expression for CYP2D6.

CYP2D6 N° Liver	Protein MS			WB	Activity nmol/min/mg	mRNA
	pmol/mg					
	HLMics	HLMits	HLMits/HLMics			
1	17.8	2.1	0.12	0.9		225.96
2	5.5	1.5	0.27	0.1		27.00
3	11.2	1.3	0.12	0.4		78.05
4	22.5	3.2	0.14	1.4		132.23
5	2.3	0	0	0.0		54.41
6	12.1	2.6	0.21	1.3		66.74
7	26.4	4.9	0.19	9.8		126.85
8	11.6	2.3	0.2	0.4		544.36
9	8.2	1.7	0.21	1.0		138.41
10	10.7	4.6	0.43	1.3		70.83
11	11.1	1.7	0.15	2.8		80.63
12	2.3	0	0	1.5		31.99
13	6.5	2.9	0.45	1.4		78.48
14	17.6	3.4	0.19	1.5		103.99
15	12.7	2.6	0.2	0.7		122.41
16	29.3	2.6	0.09	0.1		99.36
17	11.4	0	0	0.0		177.65
18	21.1	2.6	0.12	0.1		40.31
19	18.3	5.3	0.29	0.3		343.67
20	3.7	0	0	0.1		73.43
21	15.8	2.6	0.16	0.9		26.63
22	19.5	6.8	0.35	1.7		284.08
23	8.3	0	0	0.6		279.25
24	32.2	9.3	0.29	2.8		202.88
25	0	0	-	0.0		203.40
101	7.9	1.2	0.15	5.4		1496.71
102	33.2	4.1	0.12	8.7		209.59
103	82.5	16.4	0.2	21.3		180.44
104	15.2	1.8	0.12	5.9		1108.64
105	24.6	3.7	0.15	7.4		54.00
106	9.7	1.9	0.2	0.0		282.15
107	3	<LOQ	-			161.40
108	8.5	1.9	0.22	0.0		139.91
109	17.5	2.6	0.15	5.4		170.20
110	24.1	2.9	0.12	6.0		75.12
111	0	0	-	2.8		64.42
112	24.6	3.1	0.13	8.9		182.75
113	44.3	9.7	0.22	12.4		94.36
114	13.6	2.5	0.18	3.0		421.11
115	7.1	1	0.14	2.0		985.91
116	10.9	1.6	0.15	2.4		250.96
117	10.6	3.5	0.33	2.5		1159.34
118	12.2	2.2	0.18	2.7		251.97
119	37.3	5.7	0.15	7.6		242.38
120	3.8	<LOQ	-			996.52
121	33.2	5	0.15	13.5		273.87
122	17.6	5	0.28	6.0		540.42
123	16	3.5	0.22	5.2		944.14
124	14.7	3.3	0.22	4.4		137.91
125	3.7	0	0	0.0		136.62
Mean	16.3	3.1	0.16	3.4		283.5
SD	13.7	2.9	0.1	4.3		333.8

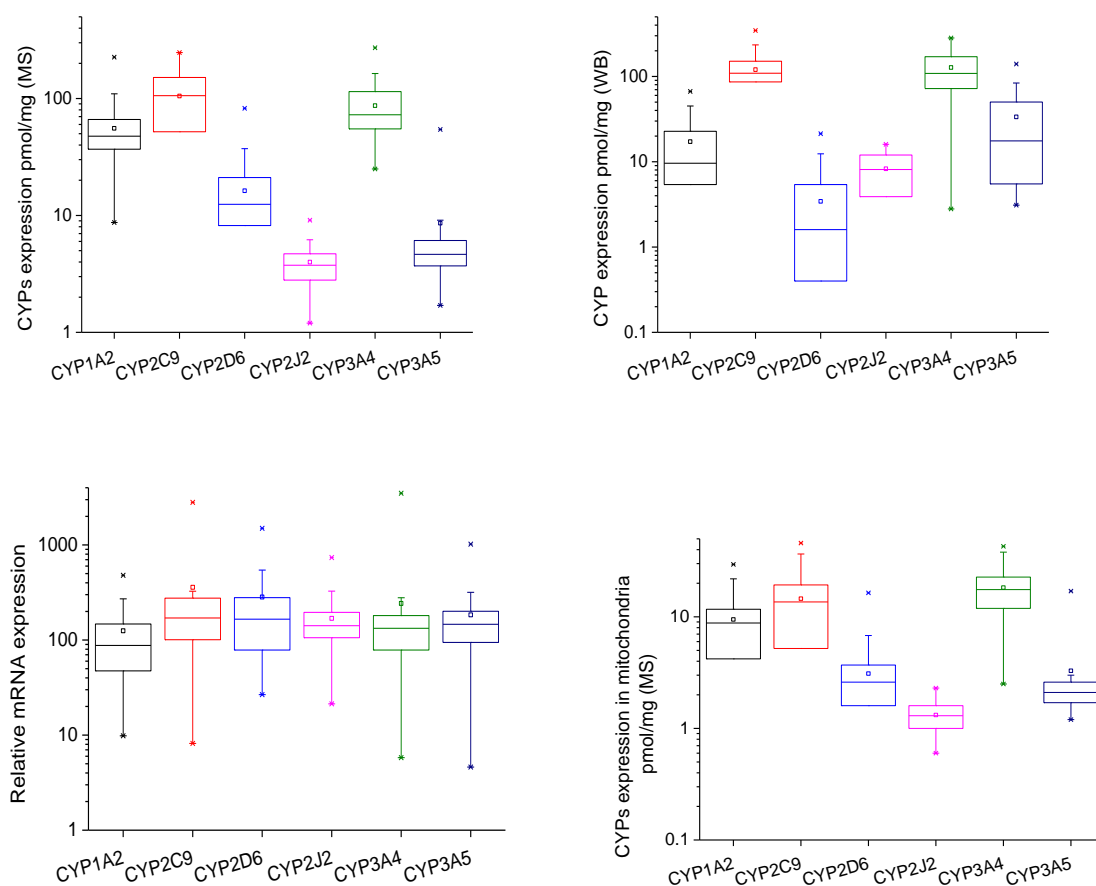


Figure (1) Box plot of the expression of 6 CYPs in HLMics, measured by MS (n=50) and by WB (n=48), and in HLMits (MS) (n=50), and the relative expression of mRNA (n=50). The bottom and top of the boxes represent the 25th and 75th percentiles, respectively. The median is indicated by a bold line. The mean is indicated by an open square. The length of the box is the interquartile range (IQR). Values more than 1.5 IQRs are labeled as dots. The Y-axis indicates “Log10 of expression”.

The results will now be analysed in the following tables. Protein expression of 6 CYP isoforms, in human liver microsomes (HLMics) and human liver Mitochondria (HLMits), from these 50 donors were quantified using MRM label-free MS method reported previously (article 1). mRNA and typical CYP enzymatic activities were also measured. All these data were finally correlated between them.

In addition the six CYP genes were entirely sequenced.

2.1.2.2.2 Phenotypic relationships

Concentrations of 6 CYPs in HLMics and HLMits are gathered in table 1. The results showed high inter-individual variability of CYP expression in HLMics (the highest was for CYP2C9, 0-247.4). Summed together these quantified CYP isoforms in HLMics correspond to about 50 % of total quantity of CYPs determined spectrally (577 ± 192 pmol/mg HLMic protein). This value is closed to the value reported previously (Kawakami *et al.*, 2011; Shimada *et al.*, 1994). The 6 CYPs isoforms were also found in HLMits but in smaller quantities compared to HLMics (lower than 45%). The presence of CYPs (family 1, 2 and 3) in low or important amounts in the HLMits has been reported previously in the liver and in other tissues such as the brain (Dutheil *et al.*, 2009; Omura, 2006; Pessayre *et al.*, 2012).

Table (1) Interindividual variability of CYPs abundance in both HLMics (n=50) and HLMits (n=50) measured by MS.

	MS_HLMics			MS_HLMits			HLMits/HLMics
	Mean \pm SD	Range	Max/Min	Mean \pm SD	Range	Max/Min	
		pmol/mg			pmol/mg		
CYP1A2	55.6 \pm 39.3	8.7 - 225.8	26	9.5 \pm 6.5	0 - 29.5	-	0.19 \pm 0.9
CYP2C9	105.1 \pm 67.4	0 - 247.4	-	14.3 \pm 11	0 - 45.8	-	0.29 \pm 0.55
CYP2D6	16.3 \pm 13.9	0 - 82.5	-	2.9 \pm 3	0 - 16.4	-	0.16 \pm 0.1
CYP2J2	4 \pm 1.7	1.2 - 9.1	7.6	1.3 \pm 0.4	0.6 - 2.3	3.8	0.37 \pm 0.15
CYP3A4	87 \pm 49.4	25 - 271.7	10.9	18.3 \pm 9.1	2.5 - 42.8	17.1	0.25 \pm 0.17
CYP3A5	8.6 \pm 11.2	1.7 - 54.4	32	3.2 \pm 3.5	<LOQ - 17	-	0.45 \pm 0.18
Sum	276.6 \pm 135.3						
Sum/CYP*	0.5 \pm 0.2						

* CYPs concentrations (577 ± 192 pmol/mg HLMic protein) were measured by spectrophotometry for HLMics only. The quantification values <LOQ, were taken as 0 for calculating the mean.

The results of CYPs quantification (MS) of HLMics was generally in the same order of magnitude compared to immunochemistry (WB) or to MS data (MRM) reported in different publications (Table

2). Our value of CYP2C9 is superior to the published data; however, this value became comparable after exclusion of three outlier samples (18, 113 and 121) with extremely high amount of CYP2C9 (over 240 pmol/mg). Our value of CYP2J2 is superior to the determined value by MS (Achour *et al.*, 2014); however, it presents 1% of total CYPs content, a value that is closed to the estimated quantity of CYP2J2 in literature (Yamazaki *et al.*, 2006). This simple method is thus applicable to CYP quantitation and will be extended to other CYPs in order to measure the wholes CYPs.

Table (2) Protein expression of 6 CYPs isoforms in HLMics (n=50) in pmol/mg protein and the amounts found by MS and WB in different references.

CYP	Quantity pmol/mg		Technique	Number of samples	Reference
	Mean±SD	Min-Max			
1A2	55.6 ± 39.3	8.7 - 225.8	MS	50	This study
	11.2 ± 17.3	0.7 - 52.4	MS	10	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	17.7 ± 0.6		MS	Pool (n=10)	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	25.1 ± 21.2	3.3 - 65.5	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	189.2 ± 52.9	165 - 263	MS	3	(Seibert <i>et al.</i> , 2009)
	29.4 ± 29.6	2.9 - 103.9	MS	24	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
		3.62 - 278.7	WB	150	(Klein <i>et al.</i> , 2010)
	52 [¥]			119	(Rowland Yeo <i>et al.</i> , 2004)
	42 ± 23		WB	60	(Shimada <i>et al.</i> , 1994)
	26.5 ± 24.7		WB	36	(Guengerich and Turvy, 1991)
		15 - 45*	WB		(Rodrigues, 1999)
2D6	16.3 ± 13.9	0 - 82.5	MS	50	This study
	30	0 - 80	MS	30	(Langenfeld <i>et al.</i> , 2009)
	3.9 ± 3.4	0.1 - 9.25	MS	10	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	11.5 ± 0.3		MS	Pool (n=10)	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	17.2 ± 8.4	6.2 - 36.4	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	11.9 ± 13.2	0.1 - 62.4	MS	24	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
	5 ± 4		WB	60	(Shimada <i>et al.</i> , 1994)
		5 - 15*	WB		(Rodrigues, 1999)
	8 [¥]			98	(Rowland Yeo <i>et al.</i> , 2004)
		0 - 33	WB	62 [£]	(Stevens <i>et al.</i> , 2008)
2C9	105.1 ± 67.4	0 - 247.4	MS	50	This study
	28.8 ± 20.6	7.6 - 61.3	MS	10	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	80.2 ± 1.4			Pool (n=10)	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	76.3 ± 26.6	40 - 115	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	40 ± 26	17.2 - 139.1	MS	23	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
	73 [¥]			174	(Rowland Yeo <i>et al.</i> , 2004)
	96*		WB	Pool (n=12)	(Rodrigues, 1999)
3A4	87 ± 49.4	25-271.7	MS	50	This study
	67, 30	9 - 322	MS	11,22	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
	8.9 ± 10.9	0.6 - 28.1	MS	10	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	64 ± 1.9		MS	Pool (n=10)	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	60.4 ± 75	6.2 - 270	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	68.1 ± 52.3	10.4 - 262.1	MS	24	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
	96 ± 51 [§]		WB	60	(Shimada <i>et al.</i> , 1994)
		40 - 108*	WB		(Rodrigues, 1999)
		10 - 130	WB		(Dennison <i>et al.</i> , 2007)
3A5	8.6 ± 11.2	1.7 - 54.4	MS	50	This study
	4, 4.7	0.2 - 34	MS	11,22	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
	0.8 ± 0.9	0.1 - 3.2	MS	10	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	3.5 ± 0.3		MS	Pool (n=10)	(Kawakami <i>et al.</i> , 2011)
	3.9 ± 3.4	2.5 - 17.1	MS	17	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 2012)
	14.2 ± 16.3	0.6 - 57.2	MS	23	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
		0 - 89.4	WB	56	(Dennison <i>et al.</i> , 2007)
	1*		WB	Pool (n=12)	(Rodrigues, 1999)
2J2	4 ± 1.7	1.2-9.1	MS	50	This study
	1.2 ± 0.7	0.3 - 2.9	MS	24	(Achour <i>et al.</i> , 2014)
		Low abundance	MS	3	(Seibert <i>et al.</i> , 2009)
		Low abundance	MS		(Sun <i>et al.</i> , 2012)
		6 - 20	WB	69 [¥]	(Gaedigk <i>et al.</i> , 2006)
		1 - 2 [§]	WB	49	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2006)

¥ Mean from a meta-analysis of data from 19 sources, * Mean of one (n=12) or three panels (n=12, 60, 60), § Values presented for 3A, £ samples >7 days-18 years, ¥ 51 prenatal (11.1 to 32 weeks) and 18 postnatal (5 days to 17 years) liver microsomal samples

The concentrations of CYPs in HLMics were also determined in the same samples by WB (Table 3). The value found for each CYPs by the two methods is close although somewhat higher with WB. Thus, the value determined by WB is overestimated as was also noticed by Wang *et al.*, 2008. It might be due by cross reactivity of antibodies. The sum of the CYPs is quite similar (MS: 276.6 vs WB: 307.5) as well as the ratio sum/CYP (50% vs 60%) (Table 1 and 3).

Table (3) Interindividual variability of CYPs abundance in HLMics, measured by by WB (n=48), and interindividual variability of mRNA levels of CYPs (n=50).

	WB_HLMics			mRNA		
	Mean \pm SD	Range	Max/Min	Mean \pm SD	Range	Max/Min
	pmol/mg			Relative expression		
CYP1A2	17.2 \pm 17.5	0 - 66.8	-	125.1 \pm 114.7	9.8 - 480.2	48.8
CYP2C9	121.3 \pm 61.8	0 -345.4	-	358.5 \pm 562.9	8.2 - 2803.7	343.2
CYP2D6	3.4 \pm 4.3	0 -21.3	-	283.5 \pm 337.2	26.6 - 1496.7	56.2
CYP2J2	6.7 \pm 5.3	0 -16	-	168.8 \pm 119.7	21.3 - 737.8	34.6
CYP3A4	124.9 \pm 70.3	2.8 - 282.6	100.9	242.7 \pm 506.9	5.8 - 3497	604
CYP3A5	34.7 \pm 39.4	3.1- 139.8	45.1	184.1 \pm 160.1	4.6 - 1020.4	221.3
Sum	307.5 \pm 102.5					
Sum/CYP*	0.6 \pm 0.2					

* CYPs concentrations (577 \pm 192 pmol/mg HLMic protein) spectrally determined. The quantification values <LOQ, were taken as 0 for calculating the mean.

MS based quantification for CYPs 1A2, 2D6 and 3A4 was strongly correlated with the immunoquantification (WB) (Table 4). The correlation between amount of CYP2J2 determined by MS and WB was moderate ($r_s=0.4$, $p<0.009$). By contrast, immunoquantification for CYP3A5 did not correlate with MS based quantification. However, WB results mainly depend on antibodies specificity, quality of standards and detection method. Cross recognition of CYP3A4 and CYP3A5 by antibodies is probably the cause of this absence of correlation.

The amount of CYPs in both HLMics and HLMits were strongly correlated except for CYP3A4 which showed moderate correlation ($r_s=0.46$, $p<0.0008$) (Table 4).

The relative mRNA expression of CYPs was also measured (Table 3). High inter-individual variability of mRNA expression was noticed for CYPs 3A4, 2C9 and 3A5 (600, 343 and 221-fold, respectively). These variations were reduced to (20, 23 and 10- fold, respectively) after exclusion of extreme values.

Correlations although modest, were found between protein and mRNA expression for CYPs 1A2 and 3A4 (Table 4). By contrast, no significant correlation was observed between protein and mRNA expression for CYPs 2D6, 2C9, 2J2 and 3A5. Similar correlation between mRNA expression and protein content of CYP1A2 were reported (Klein *et al.*, 2010). The absence of correlation between protein and mRNA expression of CYP2J2 was also reported previously (Gaedigk *et al.*, 2006). Modest or slight correlation between mRNA and protein expression for CYPs 1A2, 2C9 and 3A5 was reported (Ohtsuki *et al.*, 2012). Ohtsuki *et al.* found only a strong correlation (0.944) for CYP3A4. However, modest or uncertain correlation between mRNA and protein expression was largely reported (Bièche *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2011; Östlund and Sonnhhammer, 2012; Schwanhäusser *et al.*, 2011; Vogel and Marcotte, 2012). These findings showed that protein level is only partly regulated through mRNA level. Accordingly, many CYPs have been found to be regulated post-transcriptionally by micro RNAs (miRNAs) for instance (Yokoi and Nakajima, 2013). Thus, these results indicated that the mRNA should be used cautiously to evaluate the protein concentration (Schwanhäusser *et al.*, 2011; Vogel and Marcotte, 2012).

Table (4) Correlation among different measures of CYPs expression.

	Correlation MS_HLMics			Correlation WB_HLMics	
	HLMits MS	HLMits WB	mRNA	HLMits MS	mRNA
CYP1A2	0.67 ^a	0.71 ^a	0.46 ^b	0.3	0.3
CYP2C9	0.58 ^a	0.52 ^a	-	0.29	-
CYP2D6	0.82 ^a	0.59 ^a	-	0.59 ^a	-
CYP2J2	0.57 ^a	0.4 ^c	-	-	-
CYP3A4	0.46 ^b	0.56 ^a	0.51 ^b	0.4 ^c	-
CYP3A5	0.62 ^a	-	-	-	-0.49 ^b

^a Very significant correlation $p < 0.0001$, ^b $p < 0.0008$, ^c $p < 0.009$, (-) no significant correlation.

Then correlation by CYP pairs were investigated. Strong and significant correlations were found between protein expression (MS) levels in HLMics of the pairs: 1A2/2C9, 1A2/3A4, 1A2/2J2, 2C9/3A4, 2C9/2J2, and 3A4/2J2 (Table 5).

Table (5) Correlation among microsomal protein abundance of CYPs (MS_HLMics, n=50), spearman.

	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP2J2	CYP3A4	CYP3A5
CYP1A2	1	0,55 ^a	0,31	0,62 ^a	0,68 ^a	0,28
CYP2C9		1	0,32	0,52 ^b	0,56 ^a	-
CYP2D6			1	0,32	-	-
CYP2J2				1	0,58 ^a	-
CYP3A4					1	0,31
CYP3A5						1

^a Very significant correlation $p < 0.0001$, ^b $p = 0.0001$, (-) no significant correlation

These results can be explained by common regulation involving transcriptional (nuclear receptors) or post-transcriptional mechanism.

Enzyme activities, using Glo_1A2 and MROD, Glo_3A4 and Testosterone, for CYP1A2 and CYP3A4, respectively were measured (Table 7). Strong and very significant correlations were found between protein (quantified by MS) and activity for each substrate / CYP couple. These activities showed lower correlation with protein level immunochemically determined.

Table (7) Inter-individual variability of enzyme activity (n=48), correlation between enzyme activity and protein or mRNA expression.

		Activity			Correlation		
		Mean ± SD	Range	Max/Min	Protein		mRNA
		pmol/mg/min			MS	WB	
CYP 1A2	Glo*	252.3 ± 174.8	10 - 720	72	0,85 ^a	0.58 ^a	0.39 ^b
CYP 1A2	MROD*	45.1 ± 39.8	0 - 137.3	-	0,63 ^a	0.55 ^a	0.29
CYP 2C9	Glo	48.3 ± 34.5	10 - 180	18	0.57 ^a	0.54 ^a	-
CYP 2C9	Tolbutamide						
CYP 2D6	Dextromethorphan						
CYP 3A4	Glo [§]	45.2 ± 35.7	10 - 230	23	0.74 ^a	0.55 ^a	0.41 ^b
CYP 3A4	Testosterone [§]	325.4 ± 192	56 - 1065	19	0.77 ^a	0.59 ^a	0.42 ^b
CYP3A4+3A5	Glo				0.7 ^a		
CYP3A4+3A5	Testosterone				0.72 ^a		

^aVery significant correlation $p < 0.0001$, ^b $p < 0.006$, (-) no significant correlation, * correlation between Glo and MROD activities of CYP1A2 $r_s = 0.85$, $p < 0.0001$, [§] correlation between Glo and testosterone activities of CYP3A4 $r_s = 0.74$, $p < 0.0001$.

The Glo_1A2 and MROD activities of CYP1A2 showed strong correlation between them ($r_s = 0.85$, $p < 0.0001$). Similarly, The Glo_3A4 and Testosterone activities of CYP3A4 showed also strong correlation between them ($r_s = 0.74$, $p < 0.0001$). Although the correlation is not as good, Glo_2C9 correlates with CYP2C9. Thus, all the Glo substrates used are quite good test substrate for their CYP. They are sometimes even better than classical one (MROD for instance)

Low correlation was found between enzyme activity and mRNA expression for CYPs 1A2 and 3A4 while no correlation was found for CYP2C9. These results are quite superimposable to the correlations found between CYP (MS) and mRNA.

2.1.2.2.3 Genotypic relationships

6 CYP genes were sequenced in all samples except three (2, 107 and 120).

Only a few genetic variations in relation with CYP expression were analysed and will be presented.

CYP3A5

We found 6 expressors with genotype CYP3A5*1/*3 (*1) and 41 non expressors with genotype CYP3A5*3/*3 (*3) (Figure 2) (<http://www.cypalleles.ki.se>). Compared to HLMics, lower amount of

CYP3A5 was found in HLMits for both genotypes; HLMics and HLMits were correlated for CYP3A5. No significant difference was observed for mRNA expression between the two genotypes in disagreement with the literature without evident explanation (Lin *et al.*, 2002; Westlind-Johnsson *et al.*, 2003). However an excellent agreement was found between the expressor genotypes and the level of CYP3A5 (Figure 2). These results are not found with testosterone or Glo activity since these activities are not specific for CYP3A5.

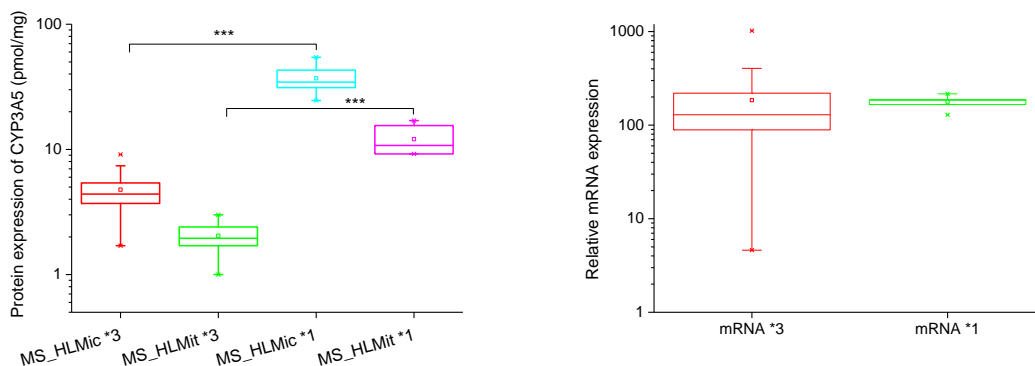


Figure (2) CYP3A5 genotype, protein contents in HLMics and HLMits, and relative mRNA expression, *** $p<0.0001$.

When the correlation between CYP3A5 and the other CYPs were separated according to the genotype expressor or not, a very strong correlation was found with CYP3A4 in good agreement with a co-regulation of these two CYPs (Table 8).

Table (8) Correlation between genotypes of CYP3A5 and protein expression of other CYPs.

	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP2J2	CYP3A4
CYP3A5*3	0.48 ^a	-	-	0.57 ^b	0.57 ^b
CYP3A5*1	-	-	-	-	0.83 ^c

^a $p=0.01$, ^b $p<0.0001$, ^c $p=0.04$, (-) no significant correlation.

CYP3A4

One sample (103) was found as heterozygous CYP3A4*22. This sample showed no significant difference with the mean of protein expression or activity of CYP3A4. This variant showed significant difference with the mean of mRNA expression of CYP3A4 ($p=0.006$). The heterozygous carriers of this variant showed uncertain reduction of CYP3A4 expression and activity (Klein *et al.*, 2012).

Nine sample were identified as heterozygous carriers of CYP3A4*1G. Strong but not complete association between CYP3A4*1G and CYP3A5*1 was previously reported (Uesugi *et al.*, 2013). This association was confirmed in our set of samples; all samples identified as CYP3A5*1 (n=6) were CYP3A4*1G ($r=0.83$, $p=0.04$) (Table 9).

Table (9) Correlation between genotypes of CYP3A5 and protein expression of other CYPs.

	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP2J2	CYP3A5*3	CYP3A5*1
CYP3A4 [§]	0.74 ^a	0.51 ^b	-	0.50 ^b	0.58 ^a	-
CYP3A4*1G	-	-	-	0.75 ^c	-	0.83 ^c

^a $p<0.0001$, ^b $p=0.001$, ^c $p= 0.02-0.04$, (-) no significant correlation. [§] all genotypes of CYP3A4 excepting CYP3A4*1G.

No significant differences were observed for protein content and enzyme activity between CYP3A4*1G and others CYP3A4 genotypes. By contrast, mRNA expression of CYP3A4*1G was significantly inferior to that of others genotypes ($p=0.01$).

2.1.2.2.4 Influence of sex, age and smoking

Sex

The mean CYP3A4 content and activity in women were greater than these in men by 1.38 and 1.37-fold, respectively, but the difference was not significant ($p=0.07$ and 0.09 , respectively). Several studies have failed to find a significant difference of CYP3A4 phenotypes between the two sexes (Achour *et al.*, 2014; Ohtsuki *et al.*, 2012).

When we analyzed separately the group of women ($n= 19$), the correlation between protein, activity and mRNA expression of CYP3A4 became better (Protein vs mRNA, $r_s=0.64$, $p=0.003$, protein vs activity, $r_s=0.86$, $p<0.0001$). This effect of sex was also observed for 2C9 for protein and activity correlation ($r_s=0.86$, $p<0.0001$) but not for mRNA.

Age

No effect of age on CYPs phenotypes was observed.

Smoking

No significant difference was observed between smoker ($n=10$) and nonsmoker ($n=16$) on CYP1A2 expression and activity. Lack of information about smoking level and the small size of compared groups can be the cause of this failure.

2.1.2.3 Conclusion

A new MS method (article1) of 6 CYP measurement was used in 50 liver microsomes and the results analysed in relation to enzymatic activities, mRNA concentration and DNA sequences of the same 6 CYPs. The methods allowed the measurement of 6 CYPs in 50 HLMics and HLMits. It is sensitive enough to measure CYPs in all HLMits samples even for a CYP of low expression (CYP2J2).

This simple and more specific than WB method, give better results in the correlations with classical enzymatic activities.

The correlations with mRNA are not as good in agreement with the fact that transcriptional regulations is not the unique one.

Correlations genotype/phenotypes are now under study. The first ones with 3A5 en 3A4 gave some interesting informations: the confirmation of expressor gentotypes and the correlation CYP3A4/CYP3A5 in expressors and the linkage between CYP3A4*1G and CYP3A5*1.

Finally, no clear age or sex effect was found.

This method give good results for CYPs quantification and should be extended to other CYPs. Analysis of Data should be completed.

2.1.2.4 References

- Achour, B., Russell, M.R., Barber, J., and Rostami-Hodjegan, A. (2014). Simultaneous Quantification of the Abundance of Several Cytochrome P450 and Uridine 5'-Diphospho-Glucuronosyltransferase Enzymes in Human Liver Microsomes Using Multiplexed Targeted Proteomics. *Drug Metab. Dispos.* 42, 500–510.
- Belloc, C., Baird, S., Cosme, J., Lecoœur, S., Gautier, J.C., Challine, D., de Waziers, I., Flinois, J.P., and Beaune, P.H. (1996). Human cytochromes P450 expressed in *Escherichia coli*: production of specific antibodies. *Toxicology* 106, 207–219.
- Bièche, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., Beaune, P., and de Waziers, I. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet. Genomics* 17, 731–742.
- Dutheil, F., Dauchy, S., Diry, M., Sazdovitch, V., Cloarec, O., Mellottée, L., Bièche, I., Ingelman-Sundberg, M., Flinois, J.-P., de Waziers, I., et al. (2009). Xenobiotic-metabolizing enzymes and

transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 1528–1538.

Gaedigk, A., Baker, D.W., Totah, R.A., Gaedigk, R., Pearce, R.E., Vyhldal, C.A., Zeldin, D.C., and Leeder, J.S. (2006). Variability of CYP2J2 Expression in Human Fetal Tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 523–532.

Huber, M., Bahr, I., Krätzschar, J.R., Becker, A., Müller, E.-C., Donner, P., Pohlenz, H.-D., Schneider, M.R., and Sommer, A. (2004). Comparison of proteomic and genomic analyses of the human breast cancer cell line T47D and the antiestrogen-resistant derivative T47D-r. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 43–55.

Kawakami, H., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Suzuki, T., Abe, T., and Terasaki, T. (2011). Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *J. Pharm. Sci.* 100, 341–352.

Klein, K., Winter, S., Turpeinen, M., Schwab, M., and Zanger, U.M. (2010). Pathway-Targeted Pharmacogenomics of CYP1A2 in Human Liver. *Front. Pharmacol.* 1, 129.

Klein, K., Thomas, M., Winter, S., Nussler, A.K., Niemi, M., Schwab, M., and Zanger, U.M. (2012). PPARA: A Novel Genetic Determinant of CYP3A4 In Vitro and In Vivo. *Clin. Pharmacol. Ther.* 91, 1044–1052.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lin, Y.S., Dowling, A.L.S., Quigley, S.D., Farin, F.M., Zhang, J., Lamba, J., Schuetz, E.G., and Thummel, K.E. (2002). Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol. Pharmacol.* 62, 162–172

Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Ishiguro, N., Kishimoto, W., Ludwig-Schwellinger, E., Ebner, T., et al. (2012). Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: omparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab. Dispos.* 40, 83–92.

Omura, T. (2006). Mitochondrial P450s. *Chem. Biol. Interact.* 163, 86–93.

Omura, T., and Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes I. evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2378.

Östlund, G., and Sonnhammer, E.L.L. (2012). Quality criteria for finding genes with high mRNA–protein expression correlation and coexpression correlation. *Gene* 497, 228–236.

Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M.-A., Lettéron, P., Moreau, R., and Mansouri, A. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab. Rev.* 44, 34–87.

Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342.

Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., and Guengerich, F.P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 414–423.

Uesugi, M., Hosokawa, M., Shinke, H., Hashimoto, E., Takahashi, T., Kawai, T., Matsubara, K., Ogawa, K., Fujimoto, Y., Okamoto, S., et al. (2013). Influence of cytochrome P450 (CYP) 3A4*1G polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus, probability of acute cellular rejection, and mRNA expression level of CYP3A5 rather than CYP3A4 in living-donor liver transplant patients. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 1814–1821.

Vogel, C., and Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 13, 227–232.

Westlind-Johnsson, A., Malmebo, S., Johansson, A., Otter, C., Andersson, T.B., Johansson, I., Edwards, R.J., Boobis, A.R., and Ingelman-Sundberg, M. (2003). Comparative analysis of Cyp3a expression in human liver suggests only a minor role for cyp3a5 in drug metabolism. *Drug Metab. Dispos.* 31, 755–761.

Williamson, B.L., Purkayastha, S., Hunter, C.L., Nuwaysir, L., Hill, J., Easterwood, L., and Hill, J. (2011). Quantitative protein determination for CYP induction via LC-MS/MS. *Proteomics* 11, 33–41.

Yamazaki, H., Okayama, A., Imai, N., Guengerich, F.P., and Shimizu, M. (2006). Inter-individual variation of cytochrome P4502J2 expression and catalytic activities in liver microsomes from Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* 36, 1201–1209.

Yokoi, T., and Nakajima, M. (2013). microRNAs as Mediators of Drug Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 377–400.

2.1.3 Conclusion

La méthode qui a été décrite et validée dans l'article 1 a été utilisée pour faire une étude des relations phénotypiques (ARNm, activités enzymatiques, Western blots) et génotypiques (séquence complète de l'ADN des 6 CYPs) dans 50 foies humains (microsomes et mitochondries).

Cette étude n'est pas encore terminée, il manque deux activités enzymatiques et l'analyse détaillée des séquences d'ADN qui ont été reçues très récemment. Elle a cependant été présentée dans ce travail de thèse car d'une part elle permet la validation biologique de la méthode, d'autre part quelques conclusions génotypiques et phénotypiques peuvent en être tirées dès à présent. Enfin les résultats manquants sont quantitativement très peu importants par rapport aux résultats déjà obtenus.

En résumé, les résultats de la méthode par MS sont meilleurs que ceux des WB (spécificité, meilleures corrélations avec les activités enzymatiques, non-dépendance de la qualité des anticorps, dosage réel de l'apoprotéine,...) ; les corrélations avec les activités enzymatiques sont également meilleures. Tous les CYPs étudiés existent dans les mitochondries en plus faible quantité que dans les microsomes. Pour le CYP 1A2, l'activité Glo semble plus représentative de la quantité de CYP que la MROD. Les corrélations ARNm et CYPs sont globalement faibles. L'expression du CYP3A5 selon le génotype a été parfaitement confirmée.

Ce travail pourra être terminé rapidement et soumis à publication après l'obtention des résultats de deux activités enzymatiques (CYP2D6, dextrométhorphan, et CYP2C9, tolbutamide) et l'analyse détaillée des résultats des séquences ADN.

V. Conclusions et perspectives

Le principal objectif d'une médecine personnalisée est d'optimiser les thérapies médicamenteuses adaptées à la réponse d'un individu à un médicament ou à une combinaison de médicaments. Les médicaments, principalement métabolisés dans le foie, sont principalement éliminés grâce au métabolisme ; les CYPs constituent la principale famille d'enzymes qui métabolisent la plupart des médicaments (Figure 1) et d'autres xénobiotiques lipophiles ; ils sont donc des acteurs cruciaux de l'activité et de la toxicité des médicaments.

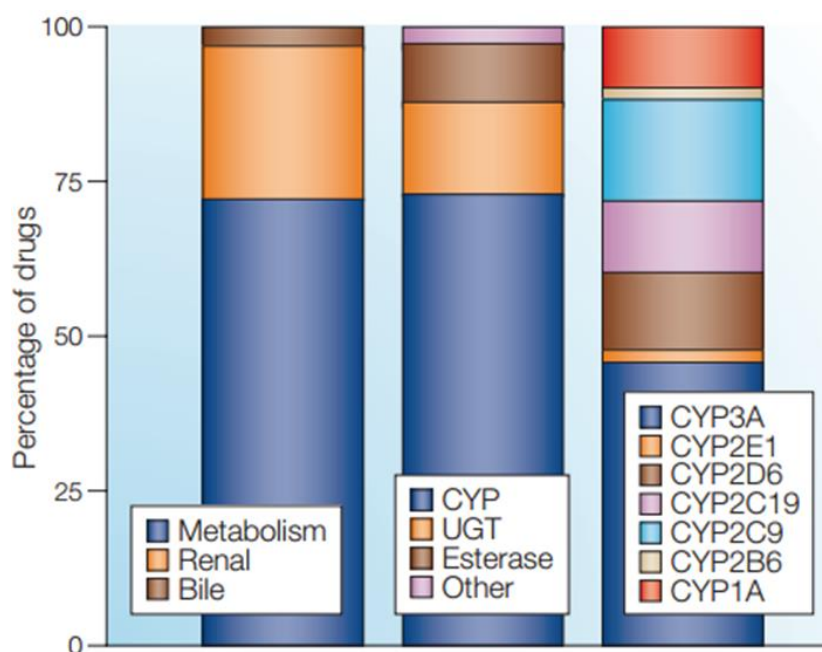


Figure (1) Voies d'élimination du « top 200 » des médicaments les plus prescrits en 2002 (Wienkers and Heath, 2005).

Le métabolisme est extrêmement variable, en fonction de la quantité et l'activité des CYPs. Une connaissance juste et précise de leur expression chez l'homme permet d'accéder à la compréhension des mécanismes d'élimination, d'efficacité et de toxicité des médicaments.

La caractérisation et le dosage de ces protéines est donc cruciale. La forte homologie de séquences entre ces protéines fait de la distinction de ces différentes isoformes un véritable challenge avec des anticorps (e.g. WB) mais aussi avec les techniques de MS.

Notre connaissance de l'expression des CYPs au niveau protéique est limitée et fondée entre autres sur des informations indirectes comme l'ARNm. Ces informations ne sont pas suffisantes car la corrélation entre l'ARNm et la protéine est faible (ce travail, Anderson and Seilhamer, 1997; Chen *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2004; Cox and Mann, 2007; Bièche *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2011). Des méthodes directes immunologiques (WB et ELISA) ont été développées dès le début des années 80 afin de doser les CYPs (Guengerich *et al.*, 1982; Paye *et al.*, 1984). Le WB est très répandu afin de déterminer l'expression des CYPs au niveau protéique (Guengerich and Turvy; 1991, Rodrigues, 1999; Tomonori *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002; Rowland Yeo *et al.*, 2004; Gaedigk *et al.*, 2006; Dennison *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2010) mais la forte homologie de séquence entre les CYPs et surtout entre les membres d'une même sous famille (3A, 2C par exemple) fait de la production d'un anticorps spécifique une réelle difficulté. Grâce au progrès dans la technologie, la spectrométrie de masse, en termes de sélectivité et sensibilité, offre une approche directe pour l'identification et la quantification des protéines y compris les CYPs. Quelques d'études ont montré l'efficacité de la spectrométrie de masse pour la quantification et la distinction entre les isoforme de la même sous famille (Achour *et al.*, 2014; Alterman *et al.*, 2005; Kawakami *et al.*, 2011; Lane *et al.*, 2004; Langenfeld *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2011; Moskaleva *et al.*, 2011; Ohtsuki *et al.*, 2012; Redlich *et al.*, 2008; Seibert *et al.*, 2009; Shrivastava *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008, 2006; Williamson *et al.*, 2011) mais aussi entre les polymorphismes qui sont différents par un seul SNP ; e.g. CYP2D6.2 est différent par deux SNPs (R296C et S486T) du CYP2D6.1 (Yu *et al.*, 2009).

Notre laboratoire avait un réel besoins de développer une méthode pour doser les différents CYPs dans plusieurs tissus (particulièrement dans le foie) mais aussi dans différents systèmes d'expression hétérologue.

Dans ce travail, nous avons établi une méthode de dosage de 6 CYPs (1A2, 2D6, 2C9, 2J2, 3A4 et 3A5 ; ils ont été choisis en fonction des intérêts les plus immédiats du laboratoire et pourront être étendus, maintenant, à la demande, à d'autres CYPs). Cette méthode, fiable, simple, rapide et peu coûteuse, a été validée dans différents types de matrices biologiques (Mic_HepG2, HT_HepG2, S9_SH et baculosomes). Cette méthode est fondée sur l'addition des PPs non marqués dans une matrice identique ou très proche de l'échantillon à doser afin de réaliser une gamme d'étalonnage externe permettant le dosage des CYPs d'intérêt. L'optimisation des étapes de préparation des échantillons (digestion trypsique) a permis d'avoir une méthode fiable et répétable. Nous avons testé cette méthode, dans un premier temps, sur différents systèmes d'expression hétérologues (lignées HepG2 et SH-SY5Y et des baculosomes exprimant chacune

un seul CYP). Dans le deuxième temps cette méthode a été appliquée sur une série de 50 foies humains (microsomes et mitochondries). L'étape d'optimisation a été longue mais nous avons réussi à mettre la méthode au point et à la valider. Des difficultés ont été rencontrées dans certains types de matrices comme le cerveau humain où la quantité des CYPs est très faible et l'effet de matrice est très important (lipides ou tubuline peut-être). Cette méthode sera appliquée sur d'autres tissus comme les reins et les foies tumoraux.

Bien que la méthode de référence utilise un IS marqué pour chaque analyte, notre méthode a montré une performance comparable à la littérature, avec de plus, l'avantage de la simplicité, de la rapidité et du faible coût d'analyse. Elle s'est montrée facilement utilisable en termes de spécificité et de sensibilité pour une utilisation en pharmaco-toxicologie. Elle pourra également être utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour le développement des médicaments (métabolisme et caractérisation des outils utilisés en routine pour les études précliniques : hépatocytes, microsomes humains...)

Notre laboratoire va développer cette méthode pour l'ensemble des CYPs métabolisant les xénobiotiques et l'adapter aux tissus dans lesquels la matrice pose problème comme par exemple les tissus contenant beaucoup de lipides ou de tubuline.

VI. Références bibliographiques

(sites web et articles)

1. Sites web

<http://www.cypalleles.ki.se>

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf

<http://expasy.org/tools/blast>

<http://web.expasy.org/protparam>

2. Articles

Achour, B., Russell, M.R., Barber, J., and Rostami-Hodjegan, A. (2014). Simultaneous quantification of the abundance of several cytochrome P450 and Uridine 5'-Diphospho-Glucuronosyltransferase enzymes in human liver microsomes using multiplexed targeted proteomics. *Drug Metab. Dispos.* 42, 500–510.

Aebersold, R., Burlingame, A.L., and Bradshaw, R.A. (2013). Western Blots versus Selected Reaction Monitoring assays: time to turn the tables? *Mol. Cell. Proteomics* 12, 2381–2382.

Aitken, A.E., and Morgan, E.T. (2007). Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1687–1693.

Alterman, M.A., Kornilayev, B., Duzhak, T., and Yakovlev, D. (2005). Quantitative analysis of cytochrome p450 isozymes by means of unique isozyme-specific tryptic peptides: a proteomic approach. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 33, 1399–1407.

Anderson, G.D., and Lynn, A.M. (2009). Optimizing pediatric dosing: a developmental pharmacologic approach. *Pharmacotherapy* 29, 680–690.

Anderson, L., and Seilhamer, J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18, 533–537.

Anderson, N.L., and Anderson, N.G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19, 1853–1861.

- Anderson, N.L., Anderson, N.G., Haines, L.R., Hardie, D.B., Olafson, R.W., and Pearson, T.W. (2004). Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies (SISCAPA). *J. Proteome Res.* 3, 235–244.
- Annesley, T.M. (2003). Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 49, 1041–1044.
- Anonymous (2013). Method of the year 2012. *Nat. Methods* 10, 1.
- Antignac, J.-P., de Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F., and Le Bizec, B. (2005). The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Anal. Chim. Acta* 529, 129–136.
- Asseffa, A., Smith, S.J., Nagata, K., Gillette, J., Gelboin, H.V., and Gonzalez, F.J. (1989). Novel exogenous heme-dependent expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 481–490.
- Avadhani, N.G., Sangar, M.C., Bansal, S., and Bajpai, P. (2011). Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals. *FEBS J.* 278, 4218–4229.
- Barter, Z.E., Perrett, H.F., Yeo, K.R., Allorge, D., Lennard, M.S., and Rostami-Hodjegan, A. (2010). Determination of a quantitative relationship between hepatic CYP3A5*1/*3 and CYP3A4 expression for use in the prediction of metabolic clearance in virtual populations. *Biopharm. Drug Dispos.* 31, 516–532.
- Beaune, P., Pessayre, D., Dansette, P., Mansuy, D., and Manns, M. (1994). Autoantibodies against cytochromes P450: role in human diseases. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 30, 199–245.
- Becker, M.L., Kallewaard, M., Caspers, P.W.J., Visser, L.E., Leufkens, H.G.M., and Stricker, B.H.C. (2007). Hospitalisations and emergency department visits due to drug-drug interactions: a literature review. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 16, 641–651.
- Belloc, C., Baird, S., Cosme, J., Lecoœur, S., Gautier, J.C., Challine, D., de Waziers, I., Flinois, J.P., and Beaune, P.H. (1996). Human cytochromes P450 expressed in *Escherichia coli*: production of specific antibodies. *Toxicology* 106, 207–219.
- Bergmann, U., Ahrends, R., Neumann, B., Scheler, C., and Linscheid, M.W. (2012). Application of Metal-Coded Affinity Tags (MeCAT): Absolute Protein Quantification with Top-Down and Bottom-Up Workflows by Metal-Coded Tagging. *Anal. Chem.* 84, 5268–5275.
- Bernhardt, R. (1996). Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127, 137–221.
- Beynon, R.J., Doherty, M.K., Pratt, J.M., and Gaskell, S.J. (2005). Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat. Methods* 2, 587–589.
- Bièche, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., Beaune, P., and de Waziers, I. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome

(CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet. Genomics* 17, 731–742.

Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., and Heck, A.J.R. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* 4, 484–494.

Boja, E.S., and Fales, H.M. (2001). Overalkylation of a protein digest with iodoacetamide. *Anal. Chem.* 73, 3576–3582.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F., and Garin, J. (2007). Isotope-labeled protein standards toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 2139–2149.

Buchard, A., Eefsen, M., Semb, S., Andersen, S.E., Morling, N., Bendtsen, F., Larsen, F.S., and Dalhoff, K. (2012). The role of the glutathione S-transferase genes GSTT1, GSTM1, and GSTP1 in acetaminophen-poisoned patients. *Clin. Toxicol. Phila. Pa* 50, 27–33.

Bui, P., Imaizumi, S., Beedanagari, S.R., Reddy, S.T., and Hankinson, O. (2011). Human CYP2S1 metabolizes cyclooxygenase- and lipoxygenase-derived eicosanoids. *Drug Metab. Dispos.* 39, 180–190.

Burkhart, J.M., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2012). Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *J. Proteomics* 75, 1454–1462.

Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., and Mucchino, C. (2007). ICP-MS as a novel detection system for quantitative element-tagged immunoassay of hidden peanut allergens in foods. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1851–1854.

Cascorbi, I. (2012). Drug interactions-principles, examples and clinical consequences. *Dtsch Arztebl Int* 109 (33-34), 546–556.

Chai, X., Zeng, S., and Xie, W. (2013). Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9, 253–266.

Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.-C., Taylor, J.M.G., Misek, D.E., Kardia, S.L.R., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M., et al. (2002). Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 304–313.

Choi, S.-J., Kim, M., Kim, S.-I., and Jeon, J.-K. (2003). Microplate assay measurement of cytochrome p450-carbon monoxide complexes. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 332–335.

Christensen, H., and Hermann, M. (2012). Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Front. Pharmacol.* 3.

Chuang, S.S., Helvig, C., Taimi, M., Ramshaw, H.A., Collop, A.H., Amad, M., White, J.A., Petkovich, M., Jones, G., and Korczak, B. (2004). CYP2U1, a novel human thymus- and brain-

specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 279, 6305–6314.

Clark, B.J., and Waterman, M.R. (1991). Heterologous expression of mammalian P450 in COS cells. *Methods Enzymol.* 206, 100–108.

Collier, T.S., and Muddiman, D.C. (2012). Analytical strategies for the global quantification of intact proteins. *Amino Acids* 43, 1109–1117.

Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., and Rosenthal, O. (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147, 400–402.

Cotureau, M.M., von Moltke, L.L., and Greenblatt, D.J. (2005). The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clin. Pharmacokinet.* 44, 33–60.

Cox, J., and Mann, M. (2007). Is proteomics the new genomics? *Cell* 130, 395–398.

Daly, A.K. (2006). Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin. Pharmacokinet.* 45, 13–31.

De Bock, L., Colin, P., Boussery, K., and Van Bocxlaer, J. (2012). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of cytochrome 3A4 in human liver microsomes. *Talanta* 99, 357–362.

De Bock, L., Colin, P., Boussery, K., and Van Bocxlaer, J. (2014). Quantification of cytochrome 2E1 in human liver microsomes using a validated indirect ELISA. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88, 536–541.

De Hoffmann, E., and Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications* (Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: J. Wiley).

Dennison, J.B., Jones, D.R., Renbarger, J.L., and Hall, S.D. (2007). Effect of CYP3A5 expression on vincristine metabolism with human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 553–563.

Deo, A.K., Prasad, B., Balogh, L., Lai, Y., and Unadkat, J.D. (2012). Interindividual variability in hepatic expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2): quantification by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 40, 852–855.

Devos, A., Lino Cardenas, C.L., Glowacki, F., Engels, A., Lo-Guidice, J.-M., Chevalier, D., Allorge, D., Broly, F., and Cauffiez, C. (2010). Genetic polymorphism of CYP2U1, a cytochrome P450 involved in fatty acids hydroxylation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 83, 105–110.

Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., and Alice, M.B. (1968). Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* 49, 2240–2249.

Dolman, S., Eeltink, S., Vaast, A., and Pelzing, M. (2013). Investigation of carryover of peptides in nano-liquid chromatography/mass spectrometry using packed and monolithic capillary columns. *J. Chromatogr. B* 912, 56–63.

- Downie, D., McFadyen, M.C.E., Rooney, P.H., Cruickshank, M.E., Parkin, D.E., Miller, I.D., Telfer, C., Melvin, W.T., and Murray, G.I. (2005). Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin. Cancer Res.* 11, 7369–7375.
- Duan, X., Chen, X., Yang, Y., and Zhong, D. (2007). Precolumn derivatization of cysteine residues for quantitative analysis of five major cytochrome P450 isoenzymes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 3234–3244.
- Dutheil, F., Dauchy, S., Diry, M., Sazdovitch, V., Cloarec, O., Mellottée, L., Bièche, I., Ingelman-Sundberg, M., Flinois, J.-P., de Waziers, I., Beaune, P., Declèves, X., Duyckaerts, C., and Lorient, M.A. (2009). Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 1528–1538.
- Estabrook, R.W., Hildebrandt, A.G., Baron, J., Netter, K.J., and Leibman, K. (1971). A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 132–139.
- Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., and Rosenthal, O. (1963). The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex *Biochem. Z.* 338, 741–755.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Fenselau, C., and Yao, X. (2007). Proteolytic labeling with ^{18}O for comparative proteomics studies: preparation of ^{18}O -labeled peptides and the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ peptide mixture. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 359, 135–142.
- Ferguson, C.S., and Tyndale, R.F. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 708–714.
- Fernández, S.D., Sugishama, N., Encinar, J.R., and Sanz-Medel, A. (2012). Triple quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Anal. Chem.* 84, 5851–5857.
- Fortin, T., Salvador, A., Charrier, J.P., Lenz, C., Bettsworth, F., Lacoux, X., Choquet-Kastylevsky, G., and Lemoine, J. (2009). Multiple reaction monitoring cubed for protein quantification at the low nanogram/milliliter level in nondepleted human serum. *Anal. Chem.* 81, 9343–9352.
- Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Kawajiri, K., Sogawa, K., and Muramatsu, M. (1982). Primary structure of a cytochrome P-450: coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 2793–2797.
- Gaedigk, A., Baker, D.W., Totah, R.A., Gaedigk, R., Pearce, R.E., Vyhldal, C.A., Zeldin, D.C., and Leeder, J.S. (2006). Variability of CYP2J2 expression in human fetal tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 523–532.
- Galeva, N., and Altermann, M. (2002). Comparison of one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis as a separation tool for proteomic analysis of rat liver microsomes: cytochromes P450 and other membrane proteins. *Proteomics* 2, 713–722.

- Gandhi, M., Aweeka, F., Greenblatt, R.M., and Blaschke, T.F. (2004). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 499–523.
- Gao, G., Chernock, R.D., Gay, H.A., Thorstad, W.L., Zhang, T.R., Wang, H., Ma, X.-J., Luo, Y., Lewis, J.S., Jr, and Wang, X. (2013). A novel RT-PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 132, 882–890.
- Garfinkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493–509.
- George, J., Byth, K., and Farrell, G.C. (1995a). Age but not gender selectively affects expression of individual cytochrome P450 proteins in human liver. *Biochem. Pharmacol.* 50, 727–730.
- George, J., Murray, M., Byth, K., and Farrell, G.C. (1995b). Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatol. Baltim. Md* 21, 120–128.
- Ghoshal, U., Tripathi, S., Kumar, S., Mittal, B., Chourasia, D., Kumari, N., Krishnani, N., and Ghoshal, U.C. (2013). Genetic polymorphism of cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, and CYP2E1 genes modulate susceptibility to gastric cancer in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Gastric Cancer*.
- Gillet, L.C., Navarro, P., Tate, S., Röst, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., and Aebersold, R. (2012). Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by Data-independent Acquisition: A new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 11.
- Gonzalez, F.J. (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 569, 101–110.
- Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *PROTEOMICS* 4, 3665–3685.
- Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M.A., Batt, A.-M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., et al. (2006). Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 64, 535–548.
- Guengerich, F.P. (1997). Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 43, 7–35.
- Guengerich, F.P. (2004). Cytochrome P450: What have we learned and what are the future issues? *Drug Metab. Rev.* 36, 159–197.
- Guengerich, F.P. (2005a). Human cytochrome P450 enzymes. In *cytochrome P450 structure, mechanism, and biochemistry*, P.R.O. de Montellano, ed. (Springer US), pp. 377–530.
- Guengerich, F.P. (2005b). Activation of alkyl halides by glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401, 342–353.

- Guengerich, F.P. (2006). Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* 8, E101–E111.
- Guengerich, F.P. (2008). Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 70–83.
- Guengerich, F.P., and Cheng, Q. (2011). Orphans in the human cytochrome P450 superfamily: approaches to discovering functions and relevance in pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 63, 684–699.
- Guengerich, F.P., and Munro, A.W. (2013). Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *J. Biol. Chem.* 288, 17065–17073.
- Guengerich, F.P., and Turvy, C.G. (1991). Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 1189–1194.
- Guengerich, F.P., Wang, P., and Davidson, N.K. (1982). Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and humans using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry (Mosc.)* 21, 1698–1706.
- Guilhaus, M., Selby, D., and Mlynski, V. (2000). Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 19, 65–107.
- Gupta, S.K., Guesdon, J.L., Avrameas, S., and Talwar, G.P. (1985). Solid-phase sandwich enzyme immunoassays of human chorionic gonadotropin using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 83, 159–168.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., and Aebersold, R. (1999a). Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1720–1730.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., and Aebersold, R. (1999b). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17, 994–999.
- Hanley, M.J., Cancalon, P., Widmer, W.W., and Greenblatt, D.J. (2011). The effect of grapefruit juice on drug disposition. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 267–286.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., and Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1770, 330–344.
- Harding, B.W., Wong, S.H., and Nelson, D.H. (1964). Carbon monoxide-combining substances in rat adrenal. *Biochim. Biophys. Acta* 92, 415–417.
- Hart, S.N., and Zhong, X. (2008). P450 oxidoreductase: genetic polymorphisms and implications for drug metabolism and toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 439–452.
- Hatano, O., Sagara, Y., Omura, T., and Takakusu, A. (1989). Immunocytochemical localization of adrenodoxin in bovine adrenal cortex by protein A-gold technique. *Histochemistry* 91, 89–97.

- Havliš, J., and Shevchenko, A. (2004). Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76, 3029–3036.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2509–2514.
- Headlam, M.J., Wilce, M.C.J., and Tuckey, R.C. (2003). The F–G loop region of cytochrome P450scc (CYP11A1) interacts with the phospholipid membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1617, 96–108.
- Heikkinen, A.T., Friedlein, A., Lamerz, J., Jakob, P., Cutler, P., Fowler, S., Williamson, T., Tolando, R., Lave, T., and Parrott, N. (2012). Mass spectrometry-based quantification of CYP enzymes to establish *in vitro/in vivo* scaling factors for intestinal and hepatic metabolism in Beagle Dog. *Pharm. Res.* 29, 1832–1842.
- Helvig, C., Taimi, M., Cameron, D., Jones, G., and Petkovich, M. (2011). Functional properties and substrate characterization of human CYP26A1, CYP26B1, and CYP26C1 expressed by recombinant baculovirus in insect cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 64, 258–263.
- Hernando-Rodriguez, M., Rey-Barja, N., Marichalar-Mendia, X., Rodriguez-Tojo, M.J., Acha-Sagredo, A., and Aguirre-Urizar, J.M. (2012). Role of cytochrome P-450 genetic polymorphisms in oral carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 41, 1–8.
- Hines, R.N. (2008). The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacol. Ther.* 118, 250–267.
- Hines, R.N. (2013). Developmental expression of drug metabolizing enzymes: Impact on disposition in neonates and young children. *Int. J. Pharm.* 452, 3–7.
- Hollenberg, P.F. (2002). Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. *Drug Metab. Rev.* 34, 17–35.
- Hu, S., Zhang, S., Hu, Z., Xing, Z., and Zhang, X. (2007). Detection of multiple proteins on one spot by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and application to immuno- microarray with element-tagged antibodies. *Anal. Chem.* 79, 923–929.
- Huang, H.-J., Tsai, M.-L., Chen, Y.-W., and Chen, S.-H. (2011). Quantitative shot-gun proteomics and MS-based activity assay for revealing gender differences in enzyme contents for rat liver microsome. *J. Proteomics* 74, 2734–2744.
- Huber, M., Bahr, I., Krätzschar, J.R., Becker, A., Müller, E.-C., Donner, P., Pohlenz, H.-D., Schneider, M.R., and Sommer, A. (2004). Comparison of proteomic and genomic analyses of the human breast cancer cell line T47D and the antiestrogen-resistant derivative T47D-r. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 43–55.
- Hukkanen, J., Jacob III, P., Peng, M., Dempsey, D., and Benowitz, N.L. (2010). Effects of nicotine on cytochrome P450 2A6 and 2E1 activities. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 69, 152–159.
- Ingelman-Sundberg, M. (2004). Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369, 89–104.

- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S.C., Gomez, A., and Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* 116, 496–526.
- Ingelman-Sundberg, M., and Gomez, A. (2010). The past, present and future of pharmacoepigenomics. *Pharmacogenomics* 11, 625–627.
- Iribarne, J.V., and Thomson, B.A. (1976). On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* 64, 2287–2294.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005). Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 1265–1272.
- Isin, E.M., and Guengerich, F.P. (2008). Substrate binding to cytochromes P450. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1019–1030.
- Isoherranen, N., and Thummel, K.E. (2013). Drug metabolism and transport during pregnancy: How does drug disposition change during pregnancy and what are the mechanisms that cause such changes? *Drug Metab. Dispos.* 41, 256–262.
- Ivanov, A.R., Zang, L., and Karger, B.L. (2003). Low-attomole electrospray ionization MS and MS/MS analysis of protein tryptic digests using 20-microm-*i.d.* polystyrene-divinylbenzene monolithic capillary columns. *Anal. Chem.* 75, 5306–5316.
- Jenkins, R.E., Kitteringham, N.R., Hunter, C.L., Webb, S., Hunt, T.J., Elsbey, R., Watson, R.B., Williams, D., Pennington, S.R., and Park, B.K. (2006). Relative and absolute quantitative expression profiling of cytochromes P450 using isotope-coded affinity tags. *Proteomics* 6, 1934–1947.
- Jerina, D.M., Daly, J.W., Witkop, B., Zaltzman-Nirenberg, P., and Udenfriend, S. (1970). 1,2-naphthalene oxide as an intermediate in the microsomal hydroxylation of naphthalene. *Biochemistry (Mosc.)* 9, 147–156.
- Jia, N., Liu, X., Wen, J., Qian, L., Qian, X., Wu, Y., and Fan, G. (2007). A proteomic method for analysis of CYP450s protein expression changes in carbon tetrachloride induced male rat liver microsomes. *Toxicology* 237, 1–11.
- Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M. (2010). Genetic polymorphism and toxicology-with emphasis on cytochrome P450. *Toxicol. Sci.* 120, 1–13.
- Kamiie, J., Ohtsuki, S., Iwase, R., Ohmine, K., Katsukura, Y., Yanai, K., Sekine, Y., Uchida, Y., Ito, S., and Terasaki, T. (2008). Quantitative Atlas of Membrane Transporter Proteins: Development and Application of a Highly Sensitive Simultaneous LC/MS/MS Method Combined with Novel In-silico Peptide Selection Criteria. *Pharm. Res.* 25, 1469–1483.
- Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299–2301.

- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 78, 53–68.
- Karlgren, M., Backlund, M., Johansson, I., Oscarson, M., and Ingelman-Sundberg, M. (2004). Characterization and tissue distribution of a novel human cytochrome P450-CYP2U1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 679–685.
- Katagiri, M., Ganguli, B.N., and Gunsalus, I.C. (1968). A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 243, 3543–3546.
- Kawakami, H., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Suzuki, T., Abe, T., and Terasaki, T. (2011). Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *J. Pharm. Sci.* 100, 341–352.
- Kim, S.K., and Novak, R.F. (2007). The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol. Ther.* 113, 88–120.
- Kim, Y.J., Gallien, S., van Oostrum, J., and Domon, B. (2013). Targeted proteomics strategy applied to biomarker evaluation. *Proteomics Clin. Appl.* 7, 739–747.
- Kitamura, S., Sugihara, K., Sanoh, S., Fujimoto, N., and Ohta, S. (2008). Metabolic activation of proestrogens in the environment by cytochrome P450 system. *J. Health Sci.* 54, 343–355.
- Klein, K., Winter, S., Turpeinen, M., Schwab, M., and Zanger, U.M. (2010). Pathway-targeted pharmacogenomics of CYP1A2 in human liver. *Front Pharmacol.* 1, 129.
- Kleinsasser, N.H., Harréus, U.A., Gamarra, F., Driemel, O., Hagen, R., and Buehrlen, M. (2009). Cytochrome P4502A6 stability in a mini organ culture model of human nasal mucosa for genotoxicology studies as detected by flow cytometry. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 266, 385–389.
- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376–386.
- Knochenmuss, R., and Zenobi, R. (2003). MALDI ionization: The role of In-Plume processes. *Chem. Rev.* 103, 441–452.
- Knockaert, L., Fromenty, B., and Robin, M.-A. (2011). Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiopathological role in liver injury and obesity. *FEBS J.* 278, 4252–4260.
- Kornilayev, B.A., and Alterman, M.A. (2008). Utility of polyclonal antibodies targeted toward unique tryptic peptides in the proteomic analysis of cytochrome P450 isozymes. *Toxicol. In Vitro* 22, 779–787.
- Kremers, P., Beaune, P., Cresteil, T., De Graeve, J., Columelli, S., Leroux, J.-P., and Gielen, J.E. (1981). Cytochrome P-450 monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* 118, 599–606.
- Krohn, R.I. (2002). The colorimetric detection and quantitation of total protein. *Curr. Protoc. Cell Biol.* A–3H.

Kumarakulasingham, M., Rooney, P.H., Dundas, S.R., Telfer, C., Melvin, W.T., Curran, S., and Murray, G.I. (2005). Cytochrome P450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clin. Cancer Res.* 11, 3758–3765.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lakowski, T.M., Szeitz, A., Pak, M.L., Thomas, D., Vhuiyan, M.I., Kotthaus, J., Clement, B., and Frankel, A. (2013). MS³ fragmentation patterns of monomethylarginine species and the quantification of all methylarginine species in yeast using MRM³. *J. Proteomics* 80, 43–54.

Lamba, V., Lamba, J., Yasuda, K., Strom, S., Davila, J., Hancock, M.L., Fackenthal, J.D., Rogan, P.K., Ring, B., Wrighton, S.A., et al. (2003). Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (Constitutive Androstane Receptor) expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 906–922.

Lane, C.S., Nisar, S., Griffiths, W.J., Fuller, B.J., Davidson, B.R., Hewes, J., Welham, K.J., and Patterson, L.H. (2004). Identification of cytochrome P450 enzymes in human colorectal metastases and the surrounding liver: a proteomic approach. *Eur. J. Cancer* 40, 2127–2134.

Lane, C.S., Wang, Y., Betts, R., Griffiths, W.J., and Patterson, L.H. (2007). Comparative cytochrome P450 proteomics in the livers of immunodeficient mice using ¹⁸O stable isotope labeling. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 953–962.

Langenfeld, E., Zanger, U.M., Jung, K., Meyer, H.E., and Marcus, K. (2009). Mass spectrometry-based absolute quantification of microsomal cytochrome P450 2D6 in human liver. *Proteomics* 9, 2313–2323.

Larson, J.R., Coon, M.J., and Porter, T.D. (1991). Alcohol-inducible cytochrome P-450IIE1 lacking the hydrophobic NH₂-terminal segment retains catalytic activity and is membrane-bound when expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266, 7321–7324.

Leng, S.X., McElhaney, J.E., Walston, J.D., Xie, D., Fedarko, N.S., and Kuchel, G.A. (2008). ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 63, 879–884.

León, I.R., Schwämmle, V., Jensen, O.N., and Sprenger, R.R. (2013). Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 2992–3005.

Lequin, R.M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 51, 2415–2418.

Levin, Y., Hradetzky, E., and Bahn, S. (2011). Quantification of proteins using data-independent analysis (MS^E) in simple and complex samples: a systematic evaluation. *Proteomics* 11, 3273–3287.

Lewis, D.F. (2004). 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 5, 305–318.

- Lewis, D.F. (2001). Guide to cytochrome P450 structure and function (London; New York: Taylor & Francis).
- Lewis, D.F., and Ito, Y. (2010). Human CYPs involved in drug metabolism: structures, substrates and binding affinities. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6, 661–674.
- Lewis, D.F., and Ito, Y. (2008). Chapter 1 Cytochrome P450 structure and function: an evolutionary perspective. In *Cytochromes P450 Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and Other Xenobiotics*, (UK: Costas Ioannides),.
- Liao, W.-L., Heo, G.-Y., Dodder, N.G., Pikuleva, I.A., and Turko, I.V. (2010). Optimizing the conditions of a multiple reaction monitoring assay for membrane proteins: quantification of cytochrome P450 11A1 and adrenodoxin reductase in bovine adrenal cortex and retina. *Anal. Chem.* 82, 5760–5767.
- Liao, W.-L., Heo, G.-Y., Dodder, N.G., Reem, R.E., Mast, N., Huang, S., Dipatre, P.L., Turko, I.V., and Pikuleva, I.A. (2011). Quantification of cholesterol-metabolizing P450s CYP27A1 and CYP46A1 in neural tissues reveals a lack of enzyme-product correlations in human retina but not human brain. *J. Proteome Res.* 10, 241–248.
- Liddle, C., Goodwin, B.J., George, J., Tapner, M., and Farrell, G.C. (1998). Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2411–2416.
- Lin, Y.S., Dowling, A.L.S., Quigley, S.D., Farin, F.M., Zhang, J., Lamba, J., Schuetz, E.G., and Thummel, K.E. (2002). Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol. Pharmacol.* 62, 162–172.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 25, 402–408.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Madadi, P., Amstutz, U., Rieder, M., Ito, S., Fung, V., Hwang, S., Turgeon, J., Michaud, V., Koren, G., Carleton, B.C., et al. (2013). Clinical practice guideline: CYP2D6 genotyping for safe and efficacious codeine therapy. *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.* 20, 369–396.
- Makarov (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* 72, 1156–1162.
- Mansuy, D., and Battioni, P. (2000). Diversity of reactions catalysed by heme-thiolate proteins. In *Biochemistry and Binding: Activation of small molecules*, (New York: K. Kadish, Smith, K., Guilard, R.), pp. 1–15.
- Marouga, R., David, S., and Hawkins, E. (2005). The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 669–678.

- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., and Chavez-Eng, C.M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 3019–3030.
- McLean, K.J., Hans, M., and Munro, A.W. (2012). Cholesterol, an essential molecule: diverse roles involving cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 587–593.
- Miksys, S., and Tyndale, R.F. (2006). Nicotine induces brain CYP enzymes: relevance to Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 177–180.
- Miller, N.D., Draughon, F.A., and D'Souza, D.H. (2010). Real-time reverse-transcriptase--polymerase chain reaction for *Salmonella enterica* detection from jalapeño and serrano peppers. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 367–373.
- Mitani, F., Ishimura, Y., Izumi, S., and Watanabe, K. (1979). Immunohistochemical localization of adrenodoxin and adrenodoxin reductase in bovine adrenal cortex. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 90, 317–327.
- Miyagi, M., and Rao, K.C.S. (2007). Proteolytic¹⁸O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 121–136.
- Moskaleva, N.E., Zgoda, V.G., and Archakov, A.I. (2011). Mass spectrometric determination of the quantity and enzyme activity of cytochromes P450. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 37, 131–145.
- Murray, M. (2006). Role of CYP pharmacogenetics and drug-drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 871–885.
- Murray, M., and Reidy, G.F. (1990). Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents. *Pharmacol. Rev.* 42, 85–101.
- Nahnsen, S., Bielow, C., Reinert, K., and Kohlbacher, O. (2013). Tools for label-free peptide quantification. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 549–556.
- Naik, A., and Zanger, U.M. (2013). Molecular interactions between NAFLD and xenobiotic metabolism. *Front Genet* 4, 2.
- Nakano, M., Kelly, E.J., and Rettie, A.E. (2009). Expression and characterization of CYP4V2 as a fatty acid ω -hydroxylase. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2119–2122.
- Nakano, M., Kelly, E.J., Wiek, C., Hanenberg, H., and Rettie, A.E. (2012). CYP4V2 in Bietti's Crystalline Dystrophy: ocular localization, metabolism of ω -3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.H331P variant. *Mol. Pharmacol.* 82, 679–686.
- Nebert, D.W., and Russell, D.W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet* 360, 1155–1162.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., and Levin, W. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA Mary Ann Liebert Inc* 6, 1–11.

- Nguyen, T.-A., Tychopoulos, M., Bichat, F., Zimmermann, C., Flinois, J.-P., Diry, M., Ahlberg, E., Delaforge, M., Corcos, L., Beaune, P., et al. (2008). Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from *in silico* to *ex vivo*. *Mol. Pharmacol.* 73, 1122–1133.
- Niessen, W. m. a., Manini, P., and Andreoli, R. (2006). Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 25, 881–899.
- Niggeweg, R., Köcher, T., Gentzel, M., Buscaino, A., Taipale, M., Akhtar, A., and Wilm, M. (2006). A general precursor ion-like scanning mode on quadrupole-TOF instruments compatible with chromatographic separation. *Proteomics* 6, 41–53.
- Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S., and Satoh, T. (2003). Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 123, 369–375.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F.R., Cowburn, D., and Chait, B.T. (1999). Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6591–6596.
- Oeda, K., Sakaki, T., and Ohkawa, H. (1985). Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Mary Ann Liebert Inc* 4, 203–210.
- Ohtsuki, S., Uchida, Y., Kubo, Y., and Terasaki, T. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy, and prospects. *J. Pharm. Sci.* 100, 3547–3559.
- Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Ishiguro, N., Kishimoto, W., Ludwig-Schwellinger, E., Ebner, T., and Terasaki, T. (2012). Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab. Dispos.* 40, 83–92.
- Omiecinski, C.J., Heuvel, J.P.V., Perdew, G.H., and Peters, J.M. (2011). Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.* 120, S49–S75.
- Omura, T. (2006). Mitochondrial P450s. *Chem. Biol. Interact.* 163, 86–93.
- Omura, T. (2011). Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 87, 617–640.
- Omura, T., and Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, PC1375–PC1376.
- Omura, T., and Sato, R. (1964a). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379–2385.
- Omura, T., and Sato, R. (1964b). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2378.

- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 1, 376–386.
- Ong, S.-E., Kratchmarova, I., and Mann, M. (2003). Properties of ^{13}C -substituted arginine in Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *J. Proteome Res.* 2, 173–181.
- Ortiz de Montellano, P.R. (2005). *Cytochrome P450 structure, mechanism, and biochemistry* (New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers).
- Pailleux, F., and Beaudry, F. (2012). Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 26, 881–891.
- Paine, M.F. (2006). The human intestinal cytochrome P450 “PIE.” *Drug Metab. Dispos.* 34, 880–886.
- Paine, M.J.I., Scrutton, N.S., Munro, A.W., Gutierrez, A., Roberts, G.C.K., and Wolf, C.R. (2005). Electron transfer partners of cytochrome P450. In *Cytochrome P450*, P.R.O. de Montellano, ed. (Springer US), pp. 115–148.
- Park, B.K., Laverty, H., Srivastava, A., Antoine, D.J., Naisbitt, D., and Williams, D.P. (2011). Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 192, 30–36.
- Parkinson, A. (2004). The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199, 193–209.
- Pasch, H., and Schrepp, W. (2003). *MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers* (Springer).
- Patterson, S.D., and Aebersold, R.H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* 33, 311–323.
- Patton, W.F., Schulenberg, B., and Steinberg, T.H. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT? *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 321–328.
- Paul, W., and Steinwedel, H. (1953). Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Z Naturforschung* 448.
- Paye, M., Beaune, P., Kremers, P., Guengerich, F.P., Letaw-Goujon, F., and Gielen, J. (1984). Quantification of two cytochrome P-450 isoenzymes by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 137–142.
- Peng, J., and Gygi, S.P. (2001). Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.* 36, 1083–1091.
- Pereira Navaza, A., Encinar, J.R., Ballesteros, A., González, J.M., and Sanz-Medel, A. (2009). Capillary HPLC-ICPMS and tyrosine iodination for the absolute quantification of peptides using generic standards. *Anal. Chem.* 81, 5390–5399.

- Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M.-A., Lettéron, P., Moreau, R., and Mansouri, A. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab. Rev.* 44, 34–87.
- Peterson, A.C., Russell, J.D., Bailey, D.J., Westphall, M.S., and Coon, J.J. (2012). Parallel Reaction Monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 1475–1488.
- Picotti, P., and Aebersold, R. (2012). Selected Reaction Monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat. Methods* 9, 555–566.
- Prabhakar, U., Eirikis, E., Reddy, M., Silvestro, E., Spitz, S., Pendley II, C., Davis, H.M., and Miller, B.E. (2004). Validation and comparative analysis of a multiplexed assay for the simultaneous quantitative measurement of Th1/Th2 cytokines in human serum and human peripheral blood mononuclear cell culture supernatants. *J. Immunol. Methods* 291, 27–38.
- Pratt, J.M., Simpson, D.M., Doherty, M.K., Rivers, J., Gaskell, S.J., and Beynon, R.J. (2006). Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat. Protoc.* 1, 1029–1043.
- Preissner, S.C., Hoffmann, M.F., Preissner, R., Dunkel, M., Gewiess, A., and Preissner, S. (2013). Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PLoS ONE* 8, e82562.
- Proc, J.L., Kuzyk, M.A., Hardie, D.B., Yang, J., Smith, D.S., Jackson, A.M., Parker, C.E., and Borchers, C.H. (2010). A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. *J. Proteome Res.* 9, 5422–5437.
- Qiu, F., Zheng, H., Yi, Y., Jia, Z., Cao, J., and Bi, S. (2013). Comparative evaluation of a novel TaqMan^(R) real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for hepatitis A virus detection. *J. Int. Med. Res.*
- Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2, 3–10.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I., and Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12, 1231–1245.
- Redlich, G., Zanger, U.M., Riedmaier, S., Bache, N., Giessing, A.B.M., Eisenacher, M., Stephan, C., Meyer, H.E., Jensen, O.N., and Marcus, K. (2008). Distinction between human cytochrome P450 (CYP) isoforms and identification of new phosphorylation sites by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 7, 4678–4688.
- Remmer, H. (1959). The acceleration of evipan oxidation and the demethylation of methylaminopyrine by barbiturates. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Für Exp. Pathol. Pharmacol.* 237, 296–307.
- Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab. Rev.* 34, 83–448.

- Rendic, S., and Guengerich, F.P. (2012). Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1316–1383.
- Respass, R.A., Rayfield, M.A., and Dondero, T.J. (2001). Laboratory testing and rapid HIV assays: applications for HIV surveillance in hard-to-reach populations. *AIDS Lond. Engl.* 15 Suppl 3, S49–59.
- Rivers, J., Simpson, D.M., Robertson, D.H.L., Gaskell, S.J., and Beynon, R.J. (2007). Absolute multiplexed quantitative analysis of protein expression during muscle development using QconCAT. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1416–1427.
- Rodrigues, A.D. (1999). Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping. *Biochem Pharmacol* 57, 465–480.
- Roos, P.H., Venkatachalam, A., Manz, A., Waentig, L., Koehler, C.U., and Jakubowski, N. (2008). Detection of electrophoretically separated cytochromes P450 by element-labelled monoclonal antibodies via laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1135–1147.
- Rose, F. (1833). Ueber die Verbindungen des Eiweiss mit Metalloxyden. *Ann. Phys.* 104, 132–142.
- Ross, P.L. (2004). Multiplexed protein quantitation in *saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 1154–1169.
- Rowland Yeo, K., Rostami-Hodjegan, A., and Tucker, G.T. (2004). Abundance of cytochromes P450 in human liver: a meta-analysis. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 57, 687–688.
- Ryan, D., Lu, Y.H., Kawalek, J., West, S.B., and Levin, L. (1975). Highly purified cytochrome P-448 and P=450 from rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 1134–1141.
- Saghir, S.A., Khan, S.A., and McCoy, A.T. (2012). Ontogeny of mammalian metabolizing enzymes in humans and animals used in toxicological studies. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 323–357.
- Sakamoto, A., Matsumaru, T., Ishiguro, N., Schaefer, O., Ohtsuki, S., Inoue, T., Kawakami, H., and Terasaki, T. (2011). Reliability and robustness of simultaneous absolute quantification of drug transporters, cytochrome P450 enzymes, and UDP-glucuronosyltransferases in human liver tissue by multiplexed MRM/Selected Reaction Monitoring mode tandem mass spectrometry with nano-liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* 100, 4037–4043.
- Sato, Y., Miyashita, A., Iwatsubo, T., and Usui, T. (2012a). Simultaneous absolute protein quantification of carboxylesterases 1 and 2 in human liver tissue fractions using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* 40, 1389–1396.
- Sato, Y., Nagata, M., Kawamura, A., Miyashita, A., and Usui, T. (2012b). Protein quantification of UDP-glucuronosyltransferases 1A1 and 2B7 in human liver microsomes by LC-MS/MS and correlation with glucuronidation activities. *Xenobiotica* 42, 823–829.
- Schaefer, O., Ohtsuki, S., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Sakamoto, A., Ishiguro, N., Matsumaru, T., Terasaki, T., and Ebner, T. (2012). Absolute quantification and differential

expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes, and UDP-glucuronosyltransferases in cultured primary human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 40, 93–103.

Schmidt, A., Kellermann, J., and Lottspeich, F. (2005). A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 5, 4–15.

Seibert, C., Davidson, B.R., Fuller, B.J., Patterson, L.H., Griffiths, W.J., and Wang, Y. (2009). Multiple-approaches to the identification and quantification of cytochromes P450 in human liver tissue by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 8, 1672–1681.

Selkirk, J.K., Huberman, E., and Heidelberger, C. (1971). An epoxide is an intermediate in the microsomal metabolism of the chemical carcinogen, dibenz(a,h)anthracene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1010–1016.

Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Terasaki, T., and Scherrmann, J.-M. (2011). Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol. Pharm.* 8, 1332–1341.

Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., and Guengerich, F.P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 414–423.

Shrivastava, K., Mindaye, S.T., Getie-Kebtie, M., and Alterman, M.A. (2013). Mass spectrometry-based proteomic analysis of human liver cytochrome(s) P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267, 125–136.

Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G.-Z., Vissers, J.P., and Geromanos, S.J. (2006). Absolute quantification of proteins by LCMS^E a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 144–156.

Sim, S.C., Kacevska, M., and Ingelman-Sundberg, M. (2013). Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *Pharmacogenomics J.* 13, 1–11.

Simonian, M.H., and Smith, J.A. (2006). Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 10–11.

Slaviero, K.A., Clarke, S.J., and Rivory, L.P. (2003). Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. *Lancet Oncol.* 4, 224–232.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.

Snawder, J.E., and Lipscomb, J.C. (2000). Interindividual variance of cytochrome P450 forms in human hepatic microsomes: correlation of individual forms with xenobiotic metabolism and implications in risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32, 200–209.

- Speers, A.E., and Wu, C.C. (2007). Proteomics of integral membrane proteins - theory and application. *Chem. Rev.* 107, 3687–3714.
- Stevens, J.C., Marsh, S.A., Zaya, M.J., Regina, K.J., Divakaran, K., Le, M., and Hines, R.N. (2008). Developmental changes in human liver CYP2D6 expression. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1587–1593.
- Sun, L., Zhang, Y., Tao, D., Zhu, G., Zhao, Q., Wu, Q., Liang, Z., Yang, L., Zhang, L., and Zhang, Y. (2012). SDS-PAGE-free protocol for comprehensive identification of cytochrome P450 enzymes and uridine diphosphoglucuronosyl transferases in human liver microsomes. *Proteomics* 12, 3464–3469.
- Tanaka, Y., Ido, S., Akita, Y., Yoshida, T., and Yoshida, T. (1987). Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Second Jpn-China Jt. Symp Mass Spectrom* 185– 188.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., and Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 151–153.
- Thangavel, C., Boopathi, E., and Shapiro, B.H. (2013). Inherent sex-dependent regulation of human hepatic CYP3A5. *Br. J. Pharmacol.* 168, 988–1000.
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., and Hamon, C. (2003). Tandem Mass Tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 1895–1904.
- Tian, Q., Stepaniants, S.B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M.C., Doyle, M.J., Yi, E.C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., et al. (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 960–969.
- Tipton, J.D., Tran, J.C., Catherman, A.D., Ahlf, D.R., Durbin, K.R., and Kelleher, N.L. (2011). Analysis of intact protein isoforms by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 286, 25451–25458.
- Tomonori, Watanabe, M., Moriya, H., Yamaguchi, S., Sato, T., and Kobayashi, S. (1999). No ethnic difference between Caucasian and Japanese hepatic samples in the expression frequency of CYP3A5 and CYP3A7 proteins. *Biochem. Pharmacol.* 57, 935–939.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354.
- Violette, A., Biass, D., Dutertre, S., Koua, D., Piquemal, D., Pierrat, F., Stöcklin, R., and Favreau, P. (2012). Large-scale discovery of conopeptides and conoproteins in the injectable venom of a fish-hunting cone snail using a combined proteomic and transcriptomic approach. *J. Proteomics* 75, 5215–5225.
- Wallace, B.D., and Redinbo, M.R. (2013). Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 45, 79–100.

- Wang, M.Z., Wu, J.Q., Dennison, J.B., Bridges, A.S., Hall, S.D., Kornbluth, S., Tidwell, R.R., Smith, P.C., Voyksner, R.D., Paine, M.F., et al. (2008). A gel-free MS-based quantitative proteomic approach accurately measures cytochrome P450 protein concentrations in human liver microsomes. *Proteomics* 8, 4186–4196.
- Wang, W., Zhou, H., Lin, H., Roy, S., Shaler, T.A., Hill, L.R., Norton, S., Kumar, P., Anderle, M., and Becker, C.H. (2003). Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Anal. Chem.* 75, 4818–4826.
- Wang, Y., Al-Gazzar, A., Seibert, C., Sharif, A., Lane, C., and Griffiths, W.J. (2006). Proteomic analysis of cytochromes P450: a mass spectrometry approach. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1246–1251.
- Warwood, S., Byron, A., Humphries, M.J., and Knight, D. (2013). The effect of peptide adsorption on signal linearity and a simple approach to improve reliability of quantification. *J. Proteomics.* 85, 160–164.
- Waxman, D.J., and Holloway, M.G. (2009). Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol. Pharmacol.* 76, 215–228.
- Waxman, D.J., and O'Connor, C. (2006). Growth hormone regulation of sex-dependent liver gene expression. *Mol. Endocrinol.* 20, 2613–2629.
- Wienkers, L.C., and Heath, T.G. (2005). Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 825–833.
- Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E., and Warscheid, B. (2007). Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7, 340–350.
- Wiley, W.C., and McLaren, I.H. (1955). Time-of-Flight mass spectrometer with improved resolution. *Rev Sci Instrum.* 1150.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., and Williams, K.L. (1995). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19–50.
- Williamson, B.L., Purkayastha, S., Hunter, C.L., Nuwaysir, L., Hill, J., Easterwood, L., and Hill, J. (2011). Quantitative protein determination for CYP induction via LC-MS/MS. *Proteomics* 11, 33–41.
- Wu, C.C., MacCoss, M.J., Howell, K.E., Matthews, D.E., and Yates, J.R. (2004). Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis. *Anal. Chem.* 76, 4951–4959.
- Wu, G., Nie, L., and Zhang, W. (2008). Integrative analyses of posttranscriptional regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using transcriptomic and proteomic data. *Curr. Microbiol.* 57, 18–22.

- Xiao, Y., and Guengerich, F.P. (2012). Metabolomic analysis and identification of a role for the orphan human cytochrome P450 2W1 in selective oxidation of lysophospholipids. *J. Lipid Res.* 53, 1610–1617.
- Xu, M., Ju, W., Hao, H., Wang, G., and Li, P. (2013). Cytochrome P450 2J2: distribution, function, regulation, genetic polymorphisms and clinical significance. *Drug Metab. Rev.* 45, 311–352.
- Yang, Z., and Attygalle, A.B. (2007). LC/MS characterization of undesired products formed during iodoacetamide derivatization of sulfhydryl groups of peptides. *J. Mass Spectrom.* 42, 233–243.
- Yang, X., Zhang, B., Molony, C., Chudin, E., Hao, K., Zhu, J., Gaedigk, A., Suver, C., Zhong, H., Leeder, J.S., Guengerich, F.P., Strom, S.C., Schuetz, E., Rushmore, T.H., Ulrich, R.G., Slatter, J.G., Schadt, E.E., Kasarskis, A., and Lum, P.Y. (2010). Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. *Genome Res.* 20, 1020–1036.
- Yeung, C.K., Shen, D.D., Thummel, K.E., and Himmelfarb, J. (2013). Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport. *Kidney Int.* 3, 522–528.
- Yokoi, T., and Nakajima, M. (2013). microRNAs as Mediators of Drug Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 377–400.
- Yu, A.-M., Qu, J., Felmlee, M.A., Cao, J., and Jiang, X.-L. (2009). Quantitation of human cytochrome P450 2D6 protein with immunoblot and mass spectrometry analysis. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 170–177.
- Zangar, R.C., Davydov, D.R., and Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199, 316–331.
- Zanger, U.M., and Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* 138, 103–141.
- Zhang, R., and Regnier, F.E. (2002). Minimizing resolution of isotopically coded peptides in comparative proteomics. *J. Proteome Res.* 1, 139–147.
- Zhang, H., Liu, Q., Zimmerman, L.J., Ham, A.-J.L., Slebos, R.J.C., Rahman, J., Kikuchi, T., Massion, P.P., Carbone, D.P., Billheimer, D., et al. (2011). Methods for peptide and protein quantitation by liquid chromatography-Multiple Reaction Monitoring mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.006593–M110.006593.
- Zhang, R., Sioma, C.S., Wang, S., and Regnier, F.E. (2001). Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics. *Anal. Chem.* 73, 5142–5149.
- Zhou, H., Ranish, J.A., Watts, J.D., and Aebersold, R. (2002). Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 20, 512–515.